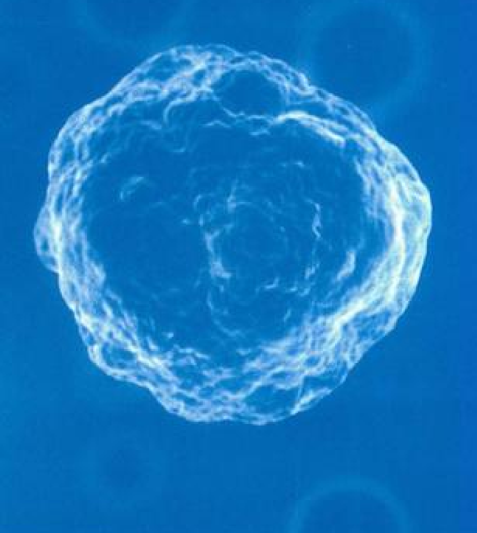
Delves • Martin • Burton • Roitt

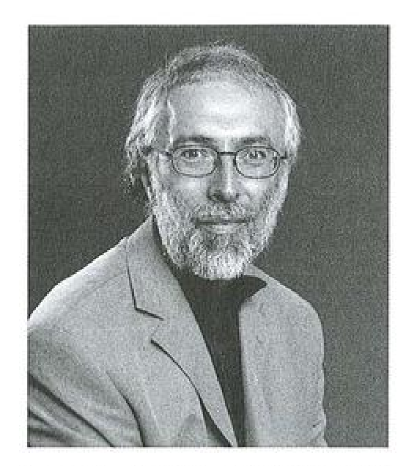
Roitt Inmunología Fundamentos

12.ª EDICIÓN



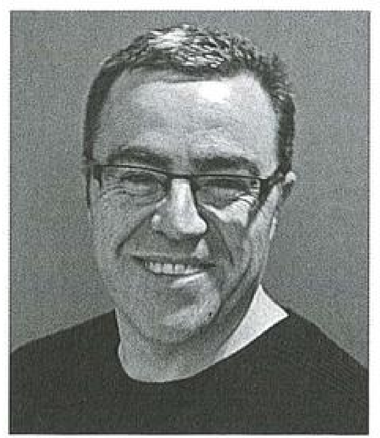
EDITORIAL MEDICA panamericana

Roitt
Inmunología
Fundamentos



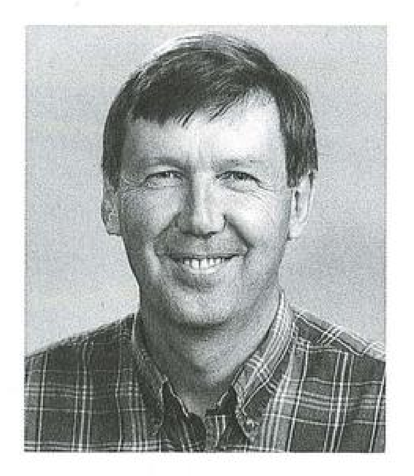
Peter J. Delves

El Profesor Delves obtuvo su doctorado en la *University of London* en 1986 y en la actualidad es profesor de Inmunología en el *University College London.* Sus investigaciones se centran en los aspectos moleculares del reconocimiento del antígeno. Escribió y publicó varios libros de inmunología y es docente de la materia en una amplia variedad de niveles.



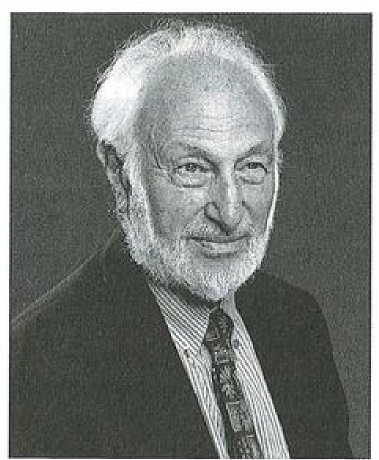
Seamus J. Martin

El Profesor Martin obtuvo su doctorado en la *National University of Ireland* en 1990 y se capacitó de posgrado en el *University College London* (con Ivan Roitt) y en *La Jolla Institute for Allergy and Immunology*, California, EE.UU. (con Doug Green). Desde 1999 es titular de la *Smurfit Chair of Medical Genetics* en el *Trinity College Dublin* y es también Investigador Principal de la *Science Foundation Ireland.* Sus investigaciones se centraron en diversos aspectos de la muerte celular programada (apoptosis) en el sistema inmunitario y en el cáncer, y ha recibido varios premios por sus trabajos en estos temas. Publicó dos libros acerca de la apoptosis y fue elegido Miembro de *The Royal Irish Academy* en 2006 y miembro de la *European Molecular Biology Organisation* (EMBO) en 2009.



Dennis R. Burton

El Profesor Burton obtuvo su licenciatura en Química en la *University of Oxford* en 1974 y su doctorado en Bioquímica *Física en la University of Lund* en Suecia en 1978. Tras un período en la *University of Sheffield,* se trasladó al *Scripps Research Institute* en La Jolla, California, donde desde 1989 es profesor de Inmunología y Biología Molecular. Sus temas de investigación giran en torno de los anticuerpos, las respuestas de anticuerpos contra patógenos y el diseño de vacunas, sobre todo en relación con el HIV.



Ivan M. Roitt

El Profesor Roitt nació en 1927 y se recibió su formación en el *King Edward's School, Birmingham,* y en el *Balliol College,* Oxford. En 1956, junto con Deborah Doniach y Peter Campbell, realizó el clásico descubrimiento de autoanticuerpos antitiroglobulina en la tiroiditis de Hashimoto, que ayudó a revelar el concepto global de la relación entre la autoinmunidad y la enfermedad humana. La investigación se extendió a un intenso estudio de los fenómenos autoinmunitarios en la anemia perniciosa y la cirrosis biliar primaria. En 1983 fue elegido miembro de *The Royal Society* y miembro honorario del *Royal College of Physicians* y de *The Royal Society of Medicine.*

Roitt Inmunología Fundamentos

12.ª EDICIÓN

Peter J. Delves
PhD
División de Infección e Inmunidad,
University College London, Reino Unido

Seamus J. Martin
PhD, FTCD, MRIA
The Smurfit Institute of Genetics Trinity College
Dublín, Irlanda

Dennis R. Burton
PhD
Departamento de Inmunología y Biología Molecular
The Scripps Research Institute
La Jolla, California, Estados Unidos

Ivan M. Roitt
MA, DSc(Oxon), FRDPath, Hon FRCP (Lond), FRS
Centre for Investigative and Diagnostic Oncology
Middlesex University, Londres, Reino Unido



BUENOS AIRES - BOGOTÁ - CARACAS - MADRID - MÉXICO - PORTO ALEGRE
e-mail: info@medicapanamericana.com
www.medicapanamericana.com

Título del original en inglés
ROITT'S ESSENTIAL IMMUNOLOGY. 12th Edition

Traducción de
EDITORIAL MÉDICA PANAMERICANA
Efectuada por la doctora Silvia Rondinone

Los editores han hecho todos los esfuerzos para localizar a los poseedores del copyright del material fuente utilizado. Si inadvertidamente hubieran omitido alguno, con gusto harán los arreglos necesarios en la primera oportunidad que se les presente para tal fin.

Gracias por comprar el original. Este libro es producto del esfuerzo de profesionales como usted, o de sus profesores, si usted es estudiante. Tenga en cuenta que fotocopiarlo es una falta de respeto hacia ellos y un robo de sus derechos intelectuales.

Las ciencias de la salud están en permanente cambio. A medida que las nuevas investigaciones y la experiencia clínica amplían nuestro conocimiento, se requieren modificaciones en las modalidades terapéuticas y en los tratamientos farmacológicos. Los autores de esta obra han verificado toda la información con fuentes confiables para asegurarse de que ésta sea completa y acorde con los estándares aceptados en el momento de la publicación. Sin embargo, en vista de la posibilidad de un error humano o de cambios en las ciencias de la salud, ni los autores, ni la editorial o cualquier otra persona implicada en la preparación o la publicación de este trabajo, garantizan que la totalidad de la información aquí contenida sea exacta o completa y no se responsabilizan por errores u omisiones o por los resultados obtenidos del uso de esta información. Se aconseja a los lectores confirmarla con otras fuentes. Por ejemplo, y en particular, se recomienda a los lectores revisar el prospecto de cada fármaco que planean administrar para cerciorarse de que la información contenida en este libro sea correcta y que no se hayan producido cambios en las dosis sugeridas o en las contraindicaciones para su administración. Esta recomendación cobra especial importancia con relación a fármacos nuevos o de uso infrecuente.



Visite nuestra página web:
http://www.medicapanamericana.com

ARGENTINA
Marcelo T. de Alvear 2145
(C1122AAG) Buenos Aires, Argentina
Tel.: (54-11) 4821-5520 / 2066 / Fax (54-11) 4821-1214
e-mail: info@medicapanamericana.com

COLOMBIA
Carrera 7a A N° 69-19 - Bogotá, Colombia
Tel.: (57-1) 345-4508 / 314-5014 / Fax: (57-1) 314-5015 / 345-0019
e-mail: infomp@medicapanamericana.com.co

ESPAÑA
Quintanapalla N° 8, Planta 4a (28050) - Madrid, España
Tel.: (34-91) 1317800 / Fax: (34-91) 4570919
e-mail: info@medicapanamericana.es

MÉXICO
Hegel N° 141, 2° piso
Colonia Chapultepec Morales
Delegación Miguel Hidalgo - C.P. 11570 -México D.F.
Tel.: (52-55) 5250-0664 / 5262-9470 / Fax: (52-55) 2624-2827
e-mail: infomp@medicapanamericana.com.mx

VENEZUELA
Edificio Polar, Torre Oeste, Piso 6, Of. 6 C
Plaza Venezuela, Urbanización Los Caobos,
Parroquia El Recreo, Municipio Libertador, Caracas
Depto. Capital, Venezuela
Tel.: (58-212) 793-2857/6906/5985/1666 Fax: (58-212) 793-5885
e-mail: info@medicapanamericana.com.ve

ISBN: 978-607-7743-93-4

Roitt : inmunología : fundamentos / Peter J. Delves … [y tres más] ; traducción de Silvia Rondinone. -- -- México : Editorial Médica Panamericana, 2014.
xiii, 542 páginas : ilustraciones ; 27 cm.

Traducción de: Roitt essential inmunology — 12th edition
Incluye índice
ISBN 978-607-7743-93-4

1. Inmunología. II. Inmunidad. I. Delves, Peter, J. II. Rondinone, Silvia, traductora. III. Título: Inmunología : fundamentos.

616.079-scdd21 Biblioteca Nacional de México

IMPRESO EN CHINA



Esta edición se terminó de imprimir en los talleres de Toppan Printing Co., (H.K) Ltd. 1, Fuk Wang Street, Yuen Long Industrial Estate, Yuen Long, New Territories, Hong Kong, People's Republic of China, en el mes de septiembre de 2013.
Se tiraron 3,000 ejemplares más sobrantes para reposición.

Índice

Agradecimientos

Agradecemos afectuosamente la contribución del equipo editorial de Wiley-Blackwell, constituido por Elizabeth Johnston, Laura Murphy y Cathryn Gates y la dirección del proyecto de Ruth Swan. Estamos en deuda con los coeditores J. Brostoff, D. Roth y D. Male, junto con los publicadores, Mosby, y las siguientes personas por brindarnos la autorización para utilizar o modificar sus figuras: J. Brostoff y A. Hall para la figura 15.11; J. Horton para la figura 11.19; y J. Taverne para las figuras 12.23 y 12.24.

IMR agradece la colaboración infatigable de su secretaria, Christine Griffin. DRB agradece particularmente las contribuciones invalorables de Amandeep Gakhal, Erin Scherer, Rena Astronomo y Wendelien Oswald. También reconoce con gratitud a Jenny Woof, Ann Feeney, Beatrice Hahn, Jim Marks, Don Mosier, Paul Sharp, Robyn Stanfield, James Stevens y Mario Stevenson por tantos comentarios útiles. PJD agradece especialmente a Per Brandtzaeg, Volker Brinkmann, Greg Campbell, Peter Lydyard, Rand Swenson y Ulrich Wahn. SJM está muy agradecido de Ed Lavelle, Sean Cullen, Cristina Munoz-Pinedo y todos los miembros de su laboratorio por los comentarios, las sugerencias y el apoyo recibido. También desea hacer llegar las mismas muestras de afecto a Mia, Madeleine y Jamie por su ayuda y tolerancia.

Los autores y el publicador realizaron los esfuerzos necesarios por comunicarse con todos los poseedores de los derechos de propiedad literaria para obtener su autorización a fin de reproducir el material con derechos. Sin embargo, si de modo inadvertido alguno fue pasado por alto, el editor estará dispuesto a realizar los arreglos necesarios en la primera oportunidad posible.

Varios otros científicos aportaron generosamente ilustraciones para incluirlas en esta edición, y les hemos reconocido nuestra gratitud mencionándolos en los epígrafes de las figuras correspondientes.

Prefacio

¡Bienvenido a esta nueva edición! Cuando Ivan Roitt escribió la primera edición, hace unos 40 años, quería sentir que le estaba hablando al lector de manera casi informal en lugar de dando un sermón, y ha sido nuestra intención mantener este estilo. Como materia, la inmunología es apasionante y dinámica, y para persuadir al lector de que es absolutamente así y pueda hacer frente a esta nueva edición, hemos hecho cambios muy amplios para actualizar la anterior. En consecuencia, aparte de la introducción de numerosas ilustraciones, hemos:

- ampliado la descripción de los patrones moleculares asociados con los patógenos y con el daño (PAMP y DAMP),
- introducido una sección nueva sobre células dendríticas y su función en el procesamiento del antígeno, que incluye la presentación cruzada,
- actualizado las secciones sobre receptores de células B y de NK,
- ampliado la descripción de la circulación de linfocitos,
- incorporado los últimos hallazgos sobre subpoblaciones de células T, sobre todo de las células Th17 y la diversidad de células T reguladoras,
- registrado la información más nueva sobre los mecanismos de destrucción de las células NK y de las células T citotóxicas,
- brindado más conocimiento sobre los efectos del envejecimiento sobre las respuestas inmunitarias,
- escrito de nuevo gran parte del capítulo sobre vacunas, con énfasis en los mecanismos de acción de las vacunas convencionales y las de hidratos de carbono y enfoques nuevos en el desarrollo de vacunas que incluye la vacunología inversa, junto con adelantos en las vacunas contra el paludismo y la acción de los adyuvantes,
- provisto información sobre novedosos defectos genéticos de las inmunodeficiencias, el origen del sida y de la plétora creciente de fármacos contra esta enfermedad a la que se agregan los resultados de los últimos ensayos clínicos de vacunas contra el HIV,
- aclarado los hallazgos recientes sobre las transformaciones celulares que conducen al cáncer, la manipulación del sistema inmunitario por los tumores y las relaciones entre infección, inflamación y cáncer,
- realizado cambios fundamentales en el capítulo sobre enfermedades autoinmunitarias.

Es nuestro deseo que el lector disfrute y se beneficie con la lectura de este libro.

Peter J. Delves
Seamus J. Martin
Dennis R. Burton
Ivan M. Roitt

Abreviaturas

Ac	anticuerpo(s)
ACh-R	receptor de acetilcolina
ACF	adyuvante completo de Freund
ACTH	corticotropina
ADA	adenosinadesaminasa
AEP	asparagina endopeptidasa
Ag	antígeno
AIRE	regulador autoimmunitario
ALBA	inmunoensayo con microesferas direccionables por láser (*addressable laser bead assay*)
ANCA	anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (*antineutrophil cytoplasmic antibodies*)
ARRE-1	elemento de respuesta de receptor para antígeno-1 (*antigen receptor response element-1*)
ARRE-2	elemento de respuesta de receptor para antígeno-2 *(antigen receptor response element-2)*
ASB	albúmina sérica bovina
AZT	zidovudina (3'-azido-3'-desoxitimidina)
BAFF	factor activador de la célula B de la familia del factor de necrosis tumoral (*B-cell-activating factor of the tumor necrosis factor family*)
BCG	bacilo de Calmette-Guérin, forma atenuada de la tuberculosis
BCR	receptor de la célula B (*B-cell receptor*)
Btk	tirosincinasa de Bruton (*Bruton 's tyrosine kinase*)
C	complemento
$C\alpha(\beta/\gamma/\delta)$	parte constante de la cadena $\alpha(\beta/\gamma/\delta)$) del TCR
Cadena J	cadena polipeptídica en la IgA dimérica y en la IgM
CALLA	antígeno común de la leucemia linfoblástica aguda (*common acute lymphoblastic leucemia)*
cAMP	adenosinmonofosfato cíclico
CCDA	citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
CCP	proteína de control del complemento (*complement control protein repeat*)
CD	grupo de diferenciación (*cluster of differentiation*)
CDR	regiones determinantes de la complementaridad de la porción variable de las Ig o los TCR (*complementarity determining regions*)
CEA	antígeno carcinoembrionario (*carcinoembryonic antigen*)
Célula B	linfocito que madura en la médula ósea
Célula T	linfocito proveniente del timo
cGMP	guanosinmonofosfato cíclico
ChIP	inmunoprecipitación de la cromatina (*chromatin immunoprecipitation)*
CHIP	proteína inhibidora de la quimiotaxis (*chemotaxis inhibitory protein*)
$C_{H(L)}$	parte constante de la cadena pesada (liviana) de la inmunoglobulina
CLA	antígeno linfocítico cutáneo (*cutaneous lymphocyte antigen*)
CLIP	péptido de la cadena invariante asociado a la clase II (*class II- associated invariant chain peptide*)
CMH	complejo mayor de histocompatibilidad
CMV	citomegalovirus
CPA	célula presentadora de antígeno
CpG	motivo dinucleótido citosina fosfato-guanosina
CR(n)	receptor "n" del complemento (*complement receptor 'n'*)
CRP	proteína C reactiva (*C-reactive protein*)
CSR	recombinación para el cambio de clase (*class switch recombination*)
CTLR	receptor de lectina de tipo C (*C-type lectin receptor*)
DAF	factor acelerador de la degradación (*decay accelerating factor*)
DAG	diacilglicerol
DAMP	patrón molecular asociado al daño (*danger-associated molecular pattern)*
DNP	dinitrofenilo
DO	densidad óptica
(DP/DQ/DR)	moléculas del complejo mayor de
DTP	vacuna triple contra difteria, tétanos y pertussis
EBV	virus de Epstein-Barr
EII	enfermedad inflamatoria intestinal
ELISA	ensayo inmunosorbente ligado a enzimas
Eø	eosinófilo
EPO	eritropoyetina
F(B)	factor (B, etc.)
Fab	fragmento monovalente de la Ig de unión al antígeno tras la digestión con papaína
$F(ab')_2$	fragmento divalente de unión al antígeno tras la digestión con pepsina
FACS	clasificador celular activado por fluorescencia (*fluorescence-activated cell sorter*)
FasL	ligando Fas
Fc	originalmente, fragmento cristalizable de la Ig; ahora parte de la Ig no Fab
$Fc\gamma R$	receptor para el fragmento Fc de la IgG
FDC	célula dendrítica folicular (*follicular dendritic cell*)
flt-3	ligando flk-2
GADS	proteína adaptadora relacionada con GRB-2
G-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos (*granulocyte colony-stimulating factor*)
GEF	factores de intercambio del nucleótido guanina (*guanine-nucleotide exchange factors*)
Gen *D*	minigén de diversidad que une los segmentos V y J para formar la región variable

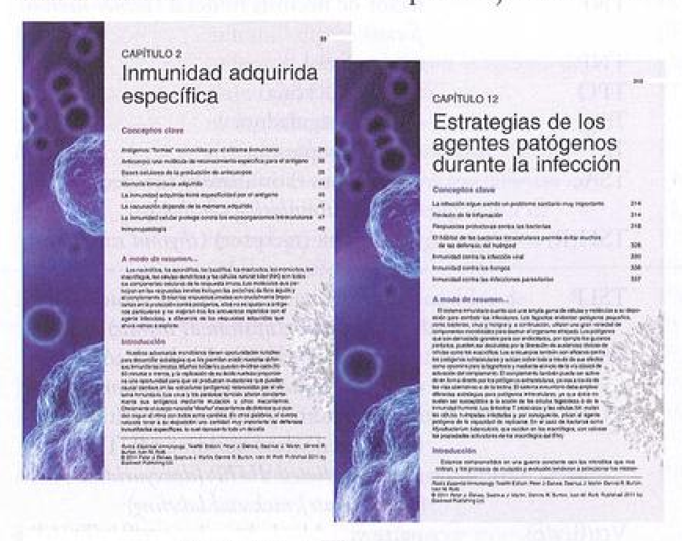
Gen *J*	gen de unión que vincula los segmentos V o D a la región constante
Gen *V*	gen de la región variable para inmunoglobulina o receptor de célula T
GM-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)
gp*n*	glucoproteína *n*kDa
GRB2	proteína de unión al receptor para el factor de crecimiento 2 (*growth factor receptor-binding protein 2*)
GSK3	cinasa glucógeno sintasa 3 (*glycogen synthase kinase 3*)
H-2	complejo mayor de histocompatibilidad murino
H-2D/K/L	loci principales para las moléculas de clase I clásicas (clase II)
HAMA	anticuerpos humanos antimurinos (*human antimouse antibodies*)
HATA	anticuerpos humanos antitoxina
HBsAg	antígeno de superficie del virus de hepatitis B
hCG	gonadotropina coriónica humana
HCMV	citomegalovirus humano
HIV	virus de la inmunodeficiencia humana
HLA	complejo mayor de histocompatibilidad humano
HLA-A/B/C	loci principales para las moléculas clásicas de clase I (clase II) histocompatibilidad (CMH) humano
HMG	grupo de movilidad alta (*high mobility group*)
HRF	factor de restricción homólogo (*homologous restriction factor*)
5HT	5-hidroxitriptamina
HTLV	virus de la leucemia de células T humana
ICAM-1	molécula de adhesión intercelular-1
Id (αId)	idiotipo (antiidiotipo)
IDC	células dendríticas interdigitadas
IDO	indolamina 2,3-dioxigenasa
IFNα	interferón α (también IFNβ, IFNγ)
Ig	inmunoglobulina
Ig-α/Ig-β	cadenas peptídicas de membrana asociadas con el receptor para la sIg de la célula B
IgG	inmunoglobulina G (también IgM, IgA, IgD, IgE)
IgIV	inmunoglobulina intravenosa
IgSF	superfamilia de inmunoglobulinas
IL-1	interleucina-1 (también IL-2, IL-3, etc.)
ILT	irradiación linfoide total
IMC	inmunidad mediada por células
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
IP_3	inositol trifosfato
IRO	especies reactivas del oxígeno
ISCOM	complejo inmunoestimulante (*immonostimulating complex*)
ITAM	motivo de activación de inmunorreceptores basado en tirosina (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*)
ITIM	motivo de inhibición de inmunorreceptores basado en tirosina (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*)
JAK	cinasas Janus (*Janus kinases*)
*K*a(d)	constante de afinidad de asociación (disociación) (por lo general, reacciones Ag-Ac)
kDa	unidades de masa molecular en kilodalton
KIR	receptores killer del tipo inmunoglobulina
KLH	hemocianina extraída del molusco "lapa californiana" (*keyhole limpet hemocyanin*)
LAK	célula killer activada por linfocina
LAMP	proteínas de membrana asociadas con lisosomas (*lysosomal-associated membrane proteins*)
LAT	conector para la activación de células T (*linker for activation of T cells*)
LATS	estimulador tiroideo de acción prolongada (*long-acting thyroid stimulator*)
LBP	proteína de unión al LPS (*LPS binding protein*)
LCM	virus de la coriomeningitis linfocítica (*lymphocytic choriomeningitis virus*)
LCR	líquido cefalorraquídeo
$Le^{a/b/x}$	antígenos de grupo sanguíneo $Lewis^{a/b/x}$
LES	lupus eritematoso sistémico
LFA-1	antígeno funcional linfocítico-1 (*lymphocyte functional antigen-1*)
LGG	linfocito granula grande
LHRH	luliberina (*luteinizing hormone releasing hormona*)
LIF	factor inhibidor de leucemia (*leukemia inhibiting factor*)
LMC	linfólisis mediada por células
LPS	lipopolisacárido (endotoxina)
LT(B)	leucotrieno (B, etc.)
LLA-T	leucemia linfoblástica aguda T
M^o	macrófago
mAc	anticuerpo monoclonal (*monoclonal antibody*)
MAC	complejo de ataque a la membrana (*membrane attack complex*)
MAdCAM	molécula de adhesión celular de adresina de la mucosa (*mucosal addressin cell adhesion molecule*)
MALT	tejido linfoide asociado a la mucosa (*mucosa-associated lymphoid tissue*)
MAM	mitógeno de *Mycoplasma arthritidis* (*Mycoplasma arthritidis* mitogen)
MAP cinasa	proteincinasa activada por mitógeno (*mitogen-activated protein*) MAPKKK proteincinasa cinasa cinasa asociada a mitógeno (*mitogen-associated protein kinase kinase kinase*)
MBL	lectina de unión a la manosa (*mannose binding lectin*)
MBP	proteína básica principal de eosinófilos (también proteína básica de mielina [*myelin basic protein*])
MCP	proteína cofactor de membrana (*membrane cofactor protein* (regulación del C')

MCP-1	proteína quimiotáctica de monocitos-1 *monocyte chemotactic protein-1*)
M-CSF	factor estimulante de colonias de macrófagos (*macrophage colonystimulating factor*)
MDP	muramil dipéptido
MICA	cadena A relacionada con la cadena de clase I del CMH (*MHC class I chain-related A chain*)
MIDAS	sitio de adhesión dependiente del ión metálico (*metal ion-dependent adhesion site*)
MIF	factor inhibidor de la migración de macrófagos (*macrophage migration inhibitory factor*)
MIIC	compartimentos enriquecidos de moléculas de clase II del CMH (*MHC class II-enriched compartments*)
MLA	monofosforil lípido A
MLR	reacción mixta de linfocitos (*mixed lymphocyte reaction*)
MMTV	virus del tumor mamario murino (*mouse mammary tumor virus*)
MSH	melanotropina (*melanocyte stimulating hormona*)
MTP	proteína de transferencia de triglicérido microsómico (*microsomal triglyceride-transfer protein*)
MuLV	virus de la leucemia murina (*murine leukemia virus*)
NADP	fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido
NAP	péptido activador de neutrófilos (*neutrophil activating peptide*)
NBT	nitro azul tetrazolio (*nitro blue tetrazolium*)
NCF	factor quimiotáctico de neutrófilos (*neutrophil chemotactic factor*)
NFAT	factor nuclear de células T activadas (*nuclear factor of activated T-cells*)
NFκB	factor de transcripción nuclear (*nuclear transcription factor*)
NK	célula natural killer
NLR	receptor de tipo nod (*nod-like receptor*)
NO·	óxido nítrico
NOD	ratón diabético no obeso (*nonobese diabetic mouse*)
NZB	ratón negro de Nueva Zelanda (*New Zealand Black Mouse*)
NZB× W	ratón negro de Nueva Zelanda × híbrido NZ blanco (*New Zealand Black mouse x NZ White Fl Irbid*)
$\cdot O^{-}_{2}$	anión superóxido
ORF	marco de lectura abierto (*open reading frame*)
PAF(-R)	factor activador de plaquetas (*platelet activating factor*) (-receptor)
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida (*polyacrylamide gel electrophoresis*)
PAMP	patrón molecular asociado a patógenos (*pathogen-associated molecular pattern*)
PBSC	células madre de sangre periférica (*peripheral blood stem cells*)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)
PERV	retrovirus endógeno porcino (*porcine endogenous retroviruses*)
PG(E)	prostaglandina (E, etc.)
PHA	fitohemaglutinina (*phytohemagglutinin*)
phox	fagocitooxidasa (*phagocyte oxidase*)
PI3K	fosfatidilinositol 3-cinasa (*phosphatidylinositol 3-kinase*)
PIAS	proteína inhibidora de STAT activado (*protein inhibitor of activated STAT*)
pIgR	receptor poli-Ig
PIP_2	fosfatidilinositol difosfato
PKC	proteincinasa C
PKR	proteincinasa dependiente de RNA
PLC	fosfolipasa C
PLCγ2	fosfolipasa Cγ2
PMN	neutrófilo polimorfonuclear
PMT	tubo fotomulplicador (*photomultiplier tube*)
PPAR	receptor activado del proliferador del peroxisoma (*peroxisome proliferator actvated receptor*)
PPD	derivado proteico purificado de *Mycobacterium tuberculosis* (*purified protein derivative*)
PRR	receptores de reconocimiento de patrones (*pattern recognition receptors*)
PTFE	politetrafluroetileno
PTI	púrpura trombocitopénica idiopática
PTK	proteína tirosincinasa (*protein tyrosine kinase*)
PWM	mitógeno de fitolaca (*pokeweed mitogen*)
RANTES	quimiocina expresada y segregada por células T normales reguladas por la activación (*regulated upon activation normal T-cell expressed and s secreted*)
RAST	prueba de radioalergosorbente (*radioallergosorbent test*)
RE	retículo endoplasmático
Rh(D)	grupo sanguíneo rhesus (D)
RIP	promotor de insulina de rata (*rat insulin promoter*)
RNAi	interferencia por RNA (ribointerferencia)
RSS	secuencia señal de recombinación (*recombination signal sequence*)
SAP	amiloide P sérico (*serum amyloid P*)
SAP	proteína activadora de esfingolípido (*sphingolipid activator protein*)
SAR	resistencia adquirida sistémica (*systemic acquired resistance*)
SCF	factor de la célula madre (*stem cell factor*)
(sc)Fv	fragmento V_H-V_L de cadena simple de unión al antígeno
scFv	fragmento de cadena simple de la región variable del anticuerpo (V_H+ V_L unidas mediante un conector flexible)
SCG	cromoglicato de sodio (*sodium cromoglycate*)
SDF	factor proveniente de la estroma (*factor stromal-derived factor*)

SDS	dodecilsulfato de sodio (*sodium dodecyl sulfate*)
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (*sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*)
SEA(B etc.)	enterotoxina de *Staphylococcus aureus* A (B, etc.)
SEREX	análisis serológico de las genotecas de expresión de de cDNA recombinante (*serological analysis of recombinant cDNA expression libraries*)
Sida	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
sIg	inmunoglobulina de superficie
siRNA	RNA interferente pequeño I (*short-interfering RNA*)
SIV	virus de la inmunodeficiencia simiana (*simian immunodeficiency virus*)
SLIT	inmunoterapia con alérgeno sublingual (*sublingual allergen immunotherapy*)
SLP76	proteína de 76 kDa del leucocito que contiene el dominio SH2 (*SH_2-domain containing leukocyte protein of 76 kDa*)
SOCs	supresor de señalización de citocina (*suppressor of cytokine signalling*)
SPE	exotoxinas piógenas estreptocócicas (*streptococcal pyogenic exotoxins*)
SRAG	síndrome respiratorio agudo grave
SRAG-CoV	SRAG asociado con coronavirus
SRID	inmunodifusión radial simple (*single radial immunodiffusion*)
SSA	superantígeno estreptocócico (*streptococcal superantigen*)
STAT	traductores de señales y activadores de la transcripción (*signal transducer and activator of transcription*)
TACI	interactor del ligando ciclofilina [CAML] y modulador del calcio y activador transmembrana (*transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand [CAML] interactor*)
TAP	transportador para el procesamiento del antígeno (*transporter for antigen processing*)
Tc	célula T citotóxica
TCF	factor de célula T (*T-cell factor*)
TCR1(2)	receptor de célula T con cadenas γ/β
TdT	desoxinucleotidil transferasa terminal (*terminal deoxynucleotidyl transferase*)
TG-A-L	polilisina con cadenas laterales de polialanina y extremos al azar de tirosina y ácido glutámico
TGFβ	factor transformante del crecimiento β
THF	factor humoral tímico
Thp	precursor de célula T helper (*T-helper precursor*)
TLR	receptor de tipo Toll
TNF	factor de necrosis tumoral (*tumor necrosis factor*)
TNP	trinitrofenol
TPO	trombopoyetina
Treg	célula T reguladora
Ts	célula T supresora
TSAc	anticuerpos estimulantes tiroideos (*thyroid stimulating antibodies*)
TSH(R)	tirotropina (receptor) (*thyroid stimulating hormone*)
TSLP	linfopoyetina de la estroma tímica (*lymphopoietin of stromal thymic*)
TSST	toxina del síndrome del shock tóxico estafilocócico (*toxic shock syndrome toxin*)
TUNEL	marcado terminal del punto crítico con trifosfato de desoxiuridina (dUTP) (*TdT-mediated dUTP [deoxyuridine triphosphate] nick end labeling*)
Vα(β/γ/δ)	parte variable de la cadena α(β/γ/δ) del TCR
vECJ	variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
VCAM	molécula de adhesión celular vascular (*vascular cell adhesion molecule*)
VCP	proteína que contienen valosina (*valosin-containing protein*)
VEGF	factor de crecimiento de la célula endotelial vascular (*vascular endothelial cell growth factor*)
V_H	parte variable de la cadena pesada de Ig
VIP	péptido intestinal vasoactivo (*vasoactive intestinal peptide*)
V_L	parte variable de la cadena liviana
$V_{\kappa/\lambda}$	parte variable de la cadena liviana κ(λ)
VIMP	proteína de membrana que interactúa con VCP (*VCP-interacting membrane protein*)
VLA	antígeno muy tardío (*very late antigen*)
VLP	partícula similar a virus (*virus-like particle*)
VNTR	número variable de repeticiones en tándem (*variable number of tandem repeats*)
VP1	péptido 1 específico de virus (*virus-specific peptide 1*)
XL	ligado al X
ZAP-70	proteína asociada a la cadena zeta de 70 kDa (*zeta chain associated protein of 70 kDa*)

Cómo obtener lo mejor de su libro

Bienvenido a la nueva edición de *Roitt Inmunología. Fundamentos.* En estas dos páginas, se mostrará cómo aprovechar al máximo las características de aprendizaje incluidas en el libro.



Características contenidas en su libro

◀ Cada capítulo tiene su propia página de comienzo que presenta sus conceptos clave

En el libro encontrará una serie de íconos que explican las características del aprendizaje:

▼

A lo largo del libro, se le indicarán los recursos relacionados disponibles en el sitio web acompañante (en inglés) mediante los siguientes íconos:

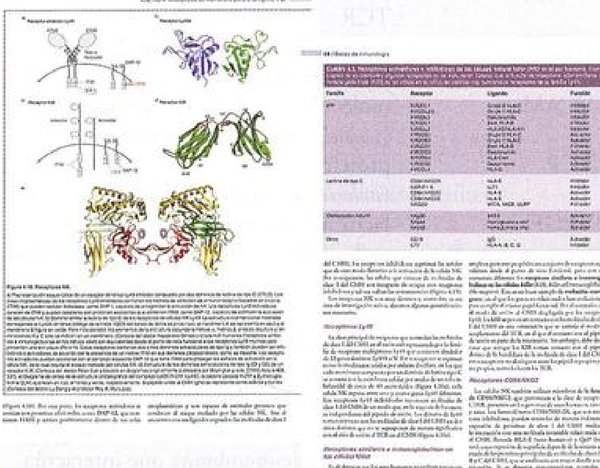
Símbolos
Artículo de la ELS
Avances y descubrimientos
Vídeo
Archivo de audio

Cuando vea el primer ícono, éste indica que hay disponible en línea (en inglés) un artículo relacionado de la ***Encyclopaedia of Life Sciences*** **(ELS)**, que le brinda más información sobre un tópico importante.

Los recuadros de **Avances y descubrimientos**, contenidos en el texto del libro, indican los desarrollos en esa disciplina.

Videos y **animaciones** que muestran los conceptos clave.

También puede utilizar **archivos breves de audio** (*podcasts*) disponibles en línea para la revisión, una vez que haya leído los capítulos.



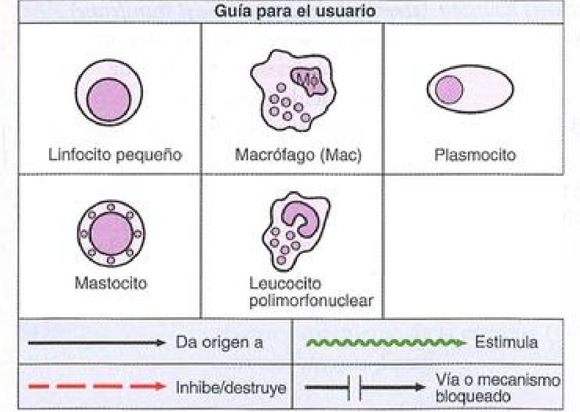
▲ Su libro contiene muchas fotografías, ilustraciones y cuadros útiles. Las fotografías y las ilustraciones pueden ser descargadas desde el sitio web.

▶ Guía iconográfica

En todas las figuras del libro se han utilizado ilustraciones uniformes para las células y los mecanismos más comunes. A continuación se muestra la clave.

Guía para las células

En todas las ilustraciones se han utilizado íconos estándares para las células y los mecanismos más comunes. A continuación se muestra la clave.



RESUMEN

Receptor de superficie de la célula B para el antígeno

- La célula B inserta en la superficie su producto génico Ig que contiene un segmento transmembrana, el cual actúa como un receptor específico para el antígeno.
- El antígeno específico induce la formación de microagregados del receptor de célula B (BCR) formados por 50-500 receptores que parecen representar la forma activa del BCR.
- La Ig de superficie forma un complejo con las proteínas de membrana Ig-α e Ig-β que son fosforiladas con la activación celular y transducen señales recibidas a través del receptor Ig para el antígeno.
- Las colas citoplasmáticas de los motivos de activación basados en tirosina (ITAM) del inmunorreceptor Ig-α e Ig-β que tras la fosforilación pueden reclutar las proteínas de unión a la fosfotirosina, cumplen funciones importantes en la transducción de la señal del BCR.
- El correceptor de la célula B actúa en sinergia con el BCR para activar productivamente las células B.

Receptor de superficie de la célula T para el antígeno

- El receptor para el antígeno es un dímero transmembrana en el que cada cadena está formada por dos dominios
- A semejanza de lo que sucede con las cadenas de Ig, cada región variable tiene tres secuencias hipervariables que intervienen en el reconocimiento del antígeno.
- El complejo CD3, compuesto por cadenas γ, δ, ε y dímeros ξ, ξη o η unidos covalentemente, forma una parte íntima del receptor y desempeña una función en la transducción de la señal después de la unión del ligando al TCR.

Generación de diversidad del anticuerpo para el reconocimiento del antígeno

- Las cadenas ligera y pesada de la Ig y las cadenas α y β del TCR suelen estar representadas en la línea germinal por 33 a 75 genes de la región variable, 2 a 27 minigenes del segmento *D* (Ig pesada y TCR β y δ sólo) y 3 a 60 segmentos *J* cortos.
- Las cadenas γ y δ del TCR son codificadas por una cantidad mucho menor de genes.
- La recombinación al azar de cualquier gen individual *V*, *D* y *J* proveniente de cada grupo génico da origen a unas $6{,}5 \times 10^3$ secuencias *VDJ* de cadena pesada de Ig, 350 cadenas ligeras, $4{,}5 \times 10^3$ TCR α, 1×10^2 TCR γδ y sólo

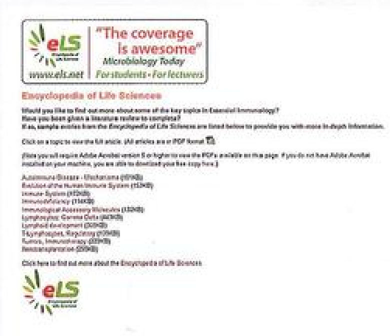
▲ Cada capítulo contiene un resumen que puede ser utilizado con fines de estudio o de revisión.

Sitio web acompañante ▶

Su libro está acompañado de un sitio web (en inglés), **www.roitt.com**, de acceso GRATUITO que contiene:

- Material de autoevaluación con preguntas de opción múltiple y sus respuestas.
- Animaciones y videos que muestran conceptos clave.
- Todas las ilustraciones y fotografías contenidas en el libro que pueden descargarse para su uso en tareas y presentaciones.
- Acceso a artículos de la *Encycopaedia of Life Sciences*.
- Listado de las referencias bibliográficas y lecturas adicionales.





Esperamos que disfrute al utilizar su nuevo libro. ¡Buena suerte con sus estudios!



Parte 1
Bases de inmunología



CAPÍTULO 1

Inmunidad innata

Conceptos clave

Introducción

Vivimos en un mundo potencialmente hostil, colmado por un número sorprendente de agentes infecciosos (Figura 1.1), de formas, tamaños, composición y agresividad diversos que, sin duda, nos utilizarían como refugios para la propagación de sus genes "egocéntricos" si no hubiéramos desarrollado a su vez un conjunto de mecanismos de defensa. Estos mecanismos son, al menos, igualmente eficaces e ingeniosos (con la excepción de muchas infecciones parasitarias, en las cuales la situación se describe mejor como una tregua incómoda y a menudo incompleta) y pueden establecer un estado de inmunidad contra la infección (lat. *immunitas,* exento de). El funcionamiento de esos mecanismos es la base de la maravillosa ciencia denominada "inmunología".

Además de los poco conocidos factores constitucionales que inducen susceptibilidad innata en una especie y confieren resistencia a ciertas infecciones en otra, se han descubierto diversos procesos antimicrobianos relativamente inespecíficos (p. ej., fagocitosis) que son **innatos** en el sentido de que no son afectados intrínsecamente por el contacto previo con el agente infeccioso. Analizaremos estos procesos y cómo, por la **inmunidad adquirida específica**, pueden aumentar su eficacia en forma notable.

Roitt's Essential Immunology. Twelfth Edition. Peter J. Delves, Seamus J. Martin, Dennis R. Burton, Ivan M. Roitt.

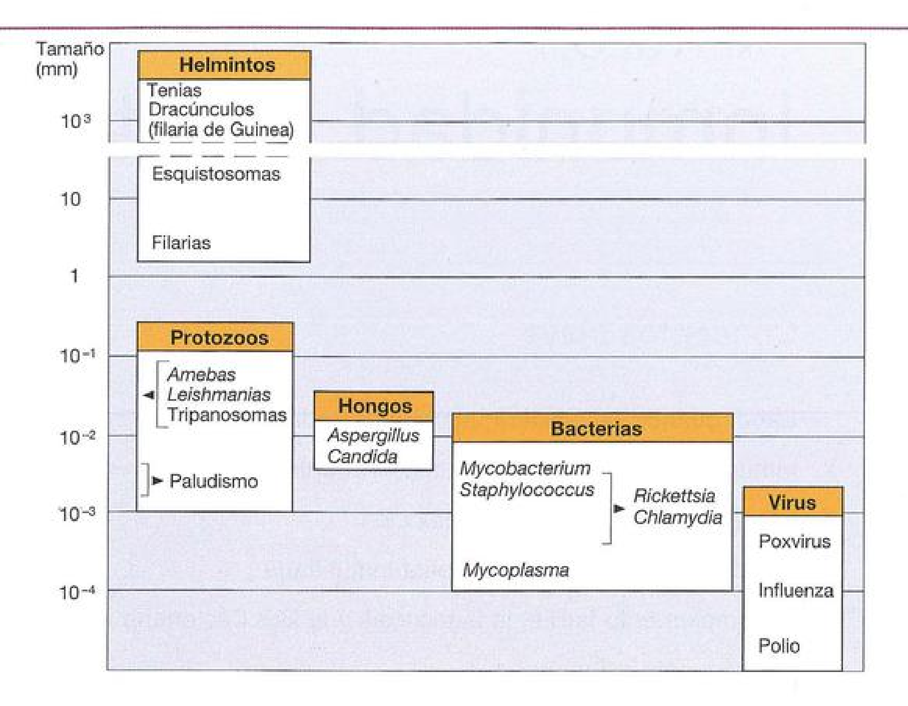


Figura 1.1. El espectro enorme de agentes infecciosos que debe enfrentar el sistema inmunitario.

Si bien no se los suele clasificar como tales porque carecen de pared celular, los micoplasmas son incluidos por conveniencia entre las bacterias. Los hongos adoptan muchas formas y se dan los valores aproximados de algunas de las formas más pequeñas.]►, variación de tamaños observados por los microorganismos indicados por la flecha;◄[, los microorganismos mencionados tienen el tamaño indicado por la flecha.

Saber cuándo se prepara una respuesta inmunitaria

La capacidad de reconocer y responder a entidades extrañas es central para el funcionamiento del sistema inmunitario

El sistema inmunitario de los vertebrados es un conglomerado de células y moléculas que cooperan para protegernos de agentes infecciosos y también nos proporciona un sistema de vigilancia para monitorizar la integridad de los tejidos del huésped. Aunque el sistema inmunitario es muy elaborado, como veremos, su función puede ser reducida a dos funciones básicas: el **reconocimiento** de sustancias y organismos extraños que han ingresado en el cuerpo y la **eliminación** de estos agentes por un repertorio diverso de células y moléculas que actúan en forma conjunta para eliminar la amenaza potencial. Por lo tanto, una función importante del sistema inmunitario es poder determinar lo que es extraño (lo que los inmunólogos suelen llamar "no propio") de lo que está normalmente presente en el cuerpo (es decir, lo propio). Las células y las moléculas que componen el sistema inmunitario innato están interesadas en detectar la presencia de **patrones moleculares** determinados que, de modo típico, se asocian con agentes infecciosos (Figura 1.2). Charlie Janeway apodó a estas moléculas como **patrones moleculares asociados con patógenos** (PAMP).

El daño tisular también puede provocar una respuesta inmunitaria

Además de la infección, hoy se sabe cada vez mejor que los daños en los tejidos que conducen a la muerte celular no fisiológica también pueden provocar la activación del sistema inmunitario (Figura 1.3). En esta situación, las moléculas que activan el sistema inmunitario derivan de lo propio, pero no están normalmente presentes en el espacio extracelular. Estas moléculas, para las que Polly Matzinger acuñó el término "**señales de peligro**", normalmente son secuestradas con seguridad dentro de las células sanas y sólo escapan cuando una célula muere a través de un modo no controlado de muerte celular, llamada **necrosis** (véase Videoclip 1). En general, la necrosis es causada por traumatismo del tejido, quemaduras, ciertas toxinas, y por otros estímulos no fisiológicos, y se caracteriza por la hinchazón rápida y la rotura de las membranas citoplasmáticas de las células dañadas. Esto permite la liberación de varios constituyentes celulares que normalmente no salen de las células sanas.

La identidad precisa de las moléculas que actúan como señales de peligro, hoy más comúnmente llamadas **patrones moleculares asociados con el peligro** (DAMPS; *danger-associated molecular patterns*) o alarminas, es un área de investigación activa en la actualidad, pero moléculas como HMGB1, una proteína de unión a la cromatina, así como las proteínas men-

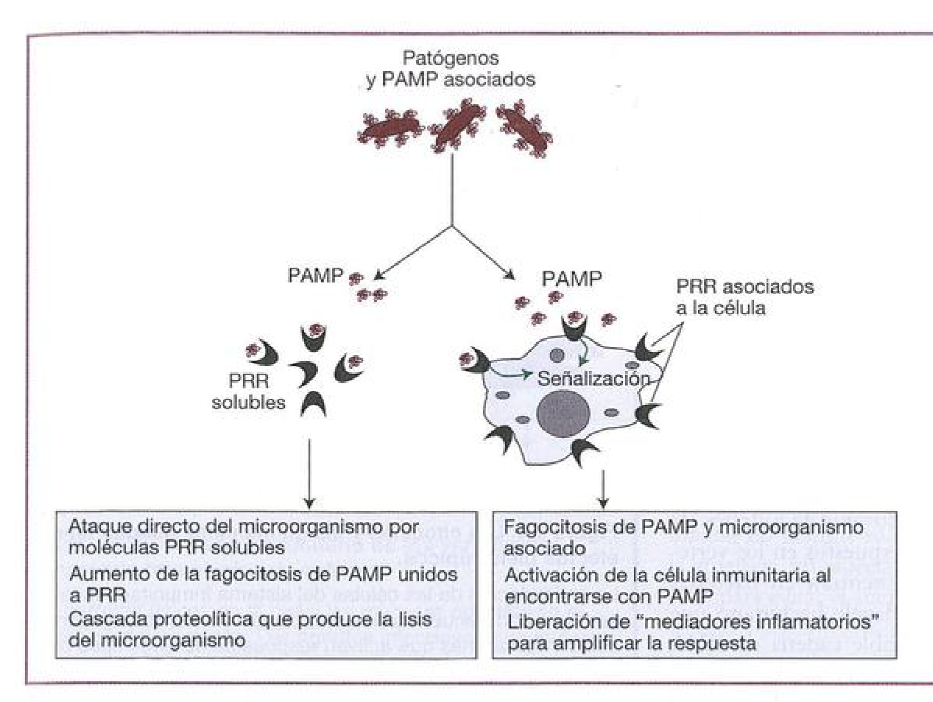


Figura 1.2. Los receptores de reconocimiento de patrón (PRR) detectan patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP) e inician las respuestas inmunitarias.

Los PRR pueden ser solubles o estar asociados con células, y pueden promover una variedad de respuestas cuando se encuentran con sus ligandos adecuados.

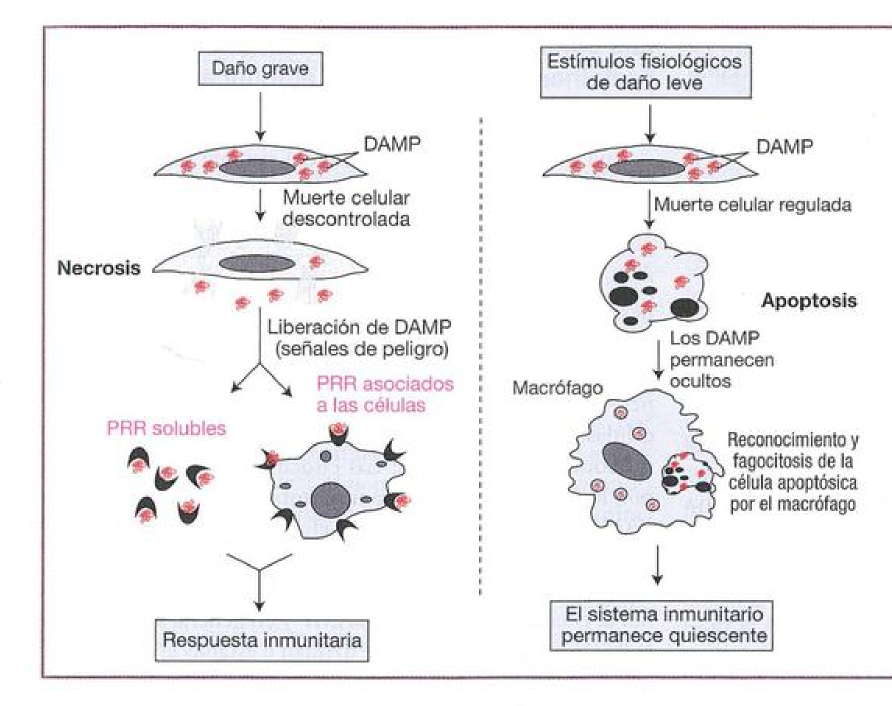


Figura 1.3. Las células necróticas liberan patrones moleculares asociados al peligro (DAMP), mientras que las células apoptósicas no lo suelen hacer.

Los estímulos que inducen necrosis causan con frecuencia daño celular grave, que conduce a la ruptura celular rápida con la consiguiente liberación de DAMP intracelulares. Entonces, los DAMP pueden atraer células del sistema inmunitario y favorecer la inflamación. Por otra parte, dado que los estímulos que inician la apoptosis suelen ser fisiológicos y relativamente leves, las células apoptósicas no se rompen y su eliminación es coordinada por los macrófagos y otras células del sistema inmunitario innato, antes de que pueda producirse la liberación de DAMP. Por esta razón, la apoptosis no suele estar asociada con la activación del sistema inmunitario.

sajeras inmunitarias interleucina 1α (IL-lα) e IL-33, son buenas candidatas. Puede parecer sorprendente que el sistema inmunitario también se active por moléculas derivadas de sí mismo; sin embargo, esto tiene sentido cuando se considera que los acontecimientos que condujeron a la muerte celular necrótica a menudo son seguidos rápidamente o acompañados por infección. Además, si un agente patógeno logra eludir la detección directa por el sistema inmunitario, su presencia será revelada si provoca necrosis en el tejido que ha invadido.

Antes de continuar, también debemos señalar que hay otra forma de muerte celular que con frecuencia se produce en el cuerpo que es natural y muy controlada y no se asocia con la rotura de la membrana plasmática y la liberación del contenido intracelular. Esta forma de muerte celular, llamada **apoptosis** (véase Videoclip 2), está bajo el control molecular complejo y se utiliza para eliminar las células que han llegado al final de su vida útil natural. Las células apoptósicas no activan el sistema inmunitario debido a que las células que mueren de esta manera muestran moléculas en sus membranas citoplasmáticas (p. ej., fosfatidilserina) que distinguen estas células para la eliminación mediante fagocitosis antes de que puedan romperse y liberar su contenido intracelular. De esta manera, los DAMP permanecen ocultos durante la apoptosis y estas células no activan el sistema inmunitario (Figura 1.3).



Los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, *pattern recognition receptors*) originan la alarma

Para distinguir los componentes propios de los agentes microbianos potencialmente peligrosos nuestros sistemas inmunitarios necesitan poder discriminar entre componentes "propios no infecciosos y no propios infecciosos" como lo describe en forma tan adecuada Janeway. El reconocimiento de los elementos no propios se logra por medio de una serie de **receptores y proteínas de reconocimiento de patrones** (denominadas en conjunto moléculas de reconocimiento de patrones) que han evolucionado para detectar componentes conservados (es decir, no propensos a la mutación) de agentes infecciosos que no están normalmente presentes en el cuerpo (p. ej., PAMP).

En la práctica, los PAMP pueden provenir de hidratos de carbono que normalmente no están expuestos en los vertebrados, de proteínas que sólo se encuentran en bacterias como flagelina (un componente del flagelo bacteriano que se utiliza para el movimiento), de doble cadena de RNA que es típico de los virus con RNA, o de muchas otras moléculas que revelan la presencia de agentes microbianos. La regla fundamental es que un PAMP no se encuentra normalmente en el cuerpo, pero es una característica común de muchos patógenos hallados con frecuencia. Las moléculas de reconocimiento de patrones también parecen estar involucradas en el reconocimiento de DAMP liberados de las células necróticas.

Al interaccionar una o más de estas moléculas de reconocimiento de patrones con un PAMP o DAMP apropiado, se produce una respuesta inmunitaria (Figura 1.2). Por fortuna, contamos con muchas maneras para afrontar una infección inminente y, de hecho, es un testimonio de la eficacia de nuestro sistema inmunitario que la mayoría de nosotros pasa la mayor parte de la vida relativamente despreocupado por las enfermedades infecciosas.

Una forma de hacer frente a los intrusos no deseados implica la unión de moléculas de reconocimiento de patrones (humoral) solubles, como el **complemento** (una serie de moléculas que trataremos más adelante en este capítulo), la **lectina de unión a la manosa**, la **proteína C reactiva** o la **lisozima**, contra el agente infeccioso. Esto puede llevar directamente a la muerte a través de la destrucción de los componentes de la pared celular microbiana y a la alteración de la membrana citoplasmática debido a las acciones de estas proteínas. Estos últimos factores humorales también se especializan en revestir a los microorganismos y mejorar su captación y posterior destrucción por las células fagocíticas. Otros receptores de reconocimiento de patrones se asocian con las células, y la interacción con estos receptores puede llevar a la **fagocitosis** del microorganismo seguida por su destrucción dentro de las vesículas fagocíticas. Igual de importante es que la interacción de los PRR celulares también produce la activación de las vías de transducción de señales que culminan con la liberación de proteínas mensajeras solubles (**citocinas**, **quimiocinas** y otras moléculas, véase a continuación) que movilizan otros componentes del sistema inmunitario.

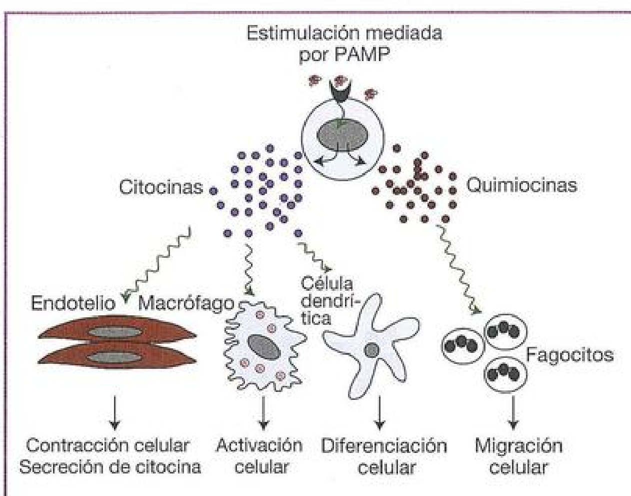


Figura 1.4. Las citocinas y las quimiocinas pueden tener efectos pleiotrópicos.
La estimulación de las células del sistema inmunitario innato conduce con frecuencia a la producción de citocinas y quimiocinas inflamatorias que activan respuestas de otros tipos celulares, como se muestra. Nótese que no se muestran todos los efectos de las quimiocinas y las citocinas.

Las células del sistema inmunitario liberan proteínas mensajeras que amplifican las respuestas inmunitarias

Una característica importante del sistema inmunitario es la capacidad de sus células constituyentes para comunicarse entre sí al encontrarse con un agente patógeno. Aunque las células del sistema inmunitario son capaces de liberar numerosas moléculas biológicamente activas con diversas funciones, dos categorías principales de proteínas (las citocinas y las quimiocinas) tienen una función muy importante en la inmunidad. Las citocinas son un grupo de proteínas que tienen efectos pleiotrópicos, como la capacidad de activar otras células, inducir la diferenciación y aumentar la actividad microbicida (Figura 1.4). Las citocinas suelen ser liberadas por las células del sistema inmunitario en respuesta a los PAMP y DAMP, y esto tiene el efecto de alterar el estado de activación y el comportamiento de otras células para impulsarlas a unirse en la lucha. Las quimiocinas también se liberan al encontrar los PAMP/DAMP y en general sirven como **factores quimiotácticos**, que ayudan a establecer un camino que guía a otras células del sistema inmunitario al sitio de infección o de daño en los tejidos. Ambos tipos de proteínas mensajeras actúan al difundir fuera de las células que las secretan y al unirse a las células equipadas con los receptores adecuados en la membrana citoplasmática para recibir estas señales. Las citocinas, las quimiocinas y sus receptores respectivos se examinan en detalle en el Capítulo 9.

Inmunidad innata versus inmunidad adaptativa



Tres niveles de defensa inmunitaria

Antes de entrar en detalles haremos un repaso acerca de cómo funciona el sistema inmunitario. En los vertebrados,

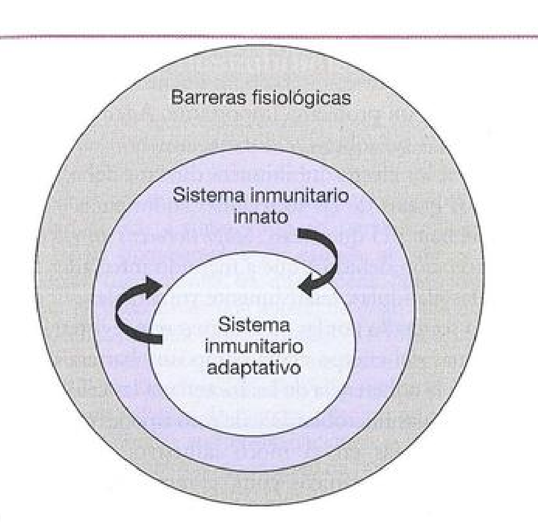


Figura 1.5. El sistema inmunitario de los vertebrados comprende tres niveles de defensa.

Las barreras físicas de la piel y las mucosas constituyen el primer nivel de defensa. Los agentes infecciosos que superan las barreras físicas son atraídos por las células y los factores solubles del sistema inmunitario innato. Éste también es responsable de la inducción de la activación del sistema inmunitario adaptativo, como se describirá más adelante en este capítulo. Las células y los productos del sistema inmunitario adaptativo refuerzan la defensa montada por el sistema inmunitario innato.

el sistema inmunitario comprende tres niveles de defensa (Figura 1.5). En primer lugar, hay una **barrera física** contra la infección que es proporcionada por la piel en las superficies externas del cuerpo, junto con las secreciones mucosas que recubren las capas epidérmicas de las superficies internas de los aparatos respiratorio, digestivo y reproductor. Cualquier agente infeccioso que intenta ingresar en el cuerpo debe primero romper estas superficies que, en gran medida, son impermeables a los microorganismos; es por esto que los cortes y los rasguños que rompen estas barreras físicas a menudo son seguidos por infección. El segundo nivel de defensa es proporcionado por el **sistema inmunitario innato,** un estrato de defensa con acción relativamente amplia, pero muy eficaz, que se ocupa en gran parte de intentar destruir a los agentes infecciosos desde el momento en que ingresan al cuerpo. Las acciones del sistema inmunitario innato también son responsables de alertar a las células que participan en el tercer nivel de defensa: el **sistema inmunitario adaptativo (o adquirido).** Estas últimas células representan las tropas de élite del sistema inmunitario y pueden lanzar un ataque que ha sido específicamente adaptado a la naturaleza del agente infeccioso con armas sofisticadas, como los anticuerpos.

Las respuestas inmunitarias innatas son inmediatas y de acción relativamente amplia

Ante la entrada de un elemento extraño en el cuerpo, la respuesta inmunitaria innata se produce casi de inmediato. Este tipo de respuestas no mejora con el encuentro frecuente con el mismo agente infeccioso. El sistema inmunitario innato reconoce componentes ampliamente conservados de agentes infecciosos, los PAMP antes mencionados, que normalmente no están presentes en el cuerpo. Al detectar un PAMP, el sistema inmunitario innato monta un ataque inmediato sobre cualquier elemento que muestra estas moléculas, ya sea tratando de endocitarlo o atacándolo con enzimas destructivas, como proteasas o proteínas de ataque de membrana (Figura 1.2). La intención clara es intimidar al intruso no deseado lo antes posible. Esto tiene sentido cuando se consideran las tasas prodigiosas de proliferación que pueden lograr las bacterias: muchas especies bacterianas son capaces de dividirse cada 20 minutos, sobre todo en el entorno de nuestro cuerpo que les proporciona gran cantidad de nutrientes. Los participantes clave en la respuesta inmunitaria innata incluyen los **macrófagos**, los **neutrófilos** y las proteínas solubles bactericidas (es decir, destructoras de bacterias) como el **complemento** y la **lisozima**. Aunque muy eficaces, las respuestas inmunitarias innatas no siempre son suficientes para reducir por completo la amenaza, en especial si el agente infeccioso está bien adaptado para evitar el ataque inicial.

Las respuestas inmunitarias adaptativas son tardías pero muy específicas

Las respuestas inmunitarias adaptativas tardan más en alcanzar una importancia funcional, en general 4-5 días después de la respuesta inmunitaria innata, pero están específicamente adaptadas a la naturaleza del agente infeccioso (en capítulos posteriores se describirá en detalle cómo se logra esto, pero por ahora no nos preocupemos por ello). Lo importante aquí es que las respuestas inmunitarias adaptativas mejoran en cada encuentro con un agente infeccioso determinado gracias a una característica denominada **memoria inmunitaria**, que apoya todo el concepto de vacunación. La respuesta inmunitaria adaptativa está mediada sobre todo por los **linfocitos T y B**; estas células muestran receptores específicos en sus membranas citoplasmáticas que pueden adaptarse para reconocer una gama casi ilimitada de estructuras. Por definición, las moléculas que son reconocidas por los linfocitos T y B se denominan **antígenos**. El reconocimiento del antígeno por un linfocito induce la proliferación y la diferenciación de estas células, lo que tiene el efecto de aumentar considerablemente el número de linfocitos capaces de reconocer el antígeno particular que activó la respuesta en primer lugar. Esto engrosa rápidamente las filas de los linfocitos capaces de enfrentar al agente infeccioso que posee el antígeno específico, y produce una **respuesta de memoria** si se encuentra con el mismo antígeno en algún momento en el futuro. Se analizarán en detalle los receptores utilizados por los linfocitos T y B al estudiar el antígeno en el Capítulo 4.

Las respuestas inmunitarias innata y adaptativa son interdependientes

Los sistemas inmunitarios innato y adaptativo actúan en conjunto para identificar y destruir los agentes infecciosos (Figura 1.5). El sistema inmunitario innato utiliza receptores y moléculas integrados (es decir, línea germinal codificada, lo que significa que dichos genes pasan en forma esencialmente idéntica de los progenitores a su descendencia) que responden a **categorías amplias** de moléculas extrañas

(PAMP) que en general se expresan sobre los microorganismos. Dado que los receptores del sistema inmunitario innato están codificados por la línea germinal, las respuestas inmunitarias innatas son similares entre los individuos de la misma especie. Por el contrario, el sistema inmunitario adaptativo utiliza receptores generados al azar que son **muy específicos** para cada agente infeccioso que entra en contacto con el sistema inmunitario. Por lo tanto, las respuestas inmunitarias adaptativas son muy variables entre los individuos de una especie y refleja la gama de agentes patógenos que ha encontrado un individuo en particular.

Así, cuando se produce una infección, el **sistema inmunitario innato actúa como una fuerza de reacción rápida** que despliega una gama de armas relativamente inespecíficas para erradicar al agente infeccioso, o al menos mantener limitada la infección. Esto da tiempo para que el sistema inmunitario adaptativo, inicialmente lento, seleccione y expanda de modo clonal las células con receptores que son capaces de inducir una respuesta mucho más específica y que se adapta de forma exclusiva al agente infeccioso. La respuesta inmunitaria adaptativa contra un agente infeccioso refuerza y agrega nuevas armas para el ataque montado por el sistema inmunitario innato.

Aunque alguna vez se consideró al sistema inmunitario innato como algo burdo y torpe en comparación con la sofisticación relativa del sistema inmunitario adaptativo, un sinnúmero de descubrimientos nuevos en los últimos 5 o 10 años ha revelado que el sistema inmunitario innato es tan adaptado y sofisticado como el sistema inmunitario adaptativo. Por otra parte, también es evidente que **el sistema inmunitario adaptativo depende en gran medida de las células del sistema inmunitario innato a efectos de saber cuándo debe responder, cómo responder y por cuánto tiempo.** Exactamente por qué esto es así se examinará más adelante en este capítulo, pero por ahora tenemos que considerar las barreras externas contra la infección con un poco más de detalle.

Barreras externas contra la infección

Como se mencionó, la forma más simple de evitar la infección es impedir el acceso de los microorganismos al cuerpo de un individuo (Figura 1.6). La piel, cuando está intacta, es impermeable a la mayoría de los agentes infecciosos; si hay pérdida cutánea, por ejemplo en las quemaduras, la infección se convierte en un problema importante. Además, la mayoría de las bacterias no sobrevive durante mucho tiempo sobre la piel debido a los efectos inhibitorios directos del ácido láctico y los ácidos grasos de las secreciones sudoríparas y sebáceas, además del bajo pH que crean. *Staphylococcus aureus* constituye una excepción debido a que a menudo infecta los folículos pilosos y las glándulas, relativamente vulnerables.

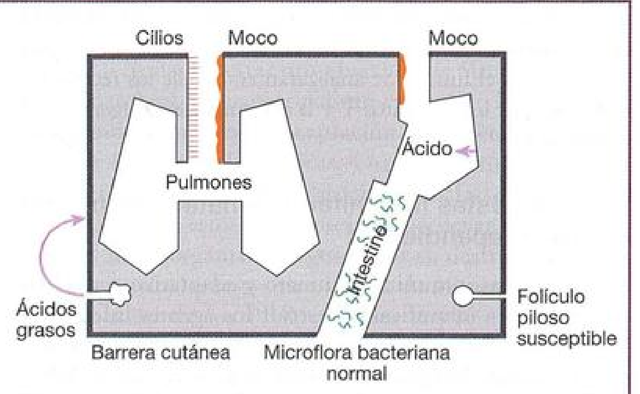


Figura 1.6. Primeras líneas de defensa contra la infección: protección en las superficies corporales externas.

El moco secretado por las membranas que revisten las superficies internas del cuerpo actúa como una barrera protectora que bloquea la adherencia de las bacterias a las células epiteliales. Las partículas microbianas y de otro tipo, extrañas al organismo y atrapadas en el moco adhesivo, son eliminadas mediante medios mecánicos, como el movimiento ciliar, la tos y el estornudo. Entre otros factores mecánicos que contribuyen a proteger las superficies epiteliales también se debe agregar la acción de lavado de las lágrimas, la saliva y la orina. Muchos de los líquidos corporales secretados contienen componentes bactericidas, como el ácido clorhídrico en el jugo gástrico, la espermina y el cinc en el semen, la lactoperoxidasa en la leche y la lisozima en las lágrimas, las secreciones nasales y la saliva.

Un mecanismo completamente diferente es el antagonismo microbiano asociado con la flora bacteriana normal del cuerpo (bacterias comensales), que suprime el crecimiento superficial de muchas bacterias y hongos potencialmente patógenos por competición con nutrientes esenciales o la producción de sustancias inhibitorias. Por ejemplo, la invasión de patógenos está limitada por el ácido láctico que producen determinadas especies de bacterias comensales, las que metabolizan el glucógeno secretado por el epitelio vaginal. Cuando los comensales protectores se ven alterados por la acción de los antibióticos, aumenta la susceptibilidad a las infecciones oportunistas por *Candida* y *Clostridium difficile*. Los comensales intestinales también pueden formar colicinas, una clase de bactericidinas que se unen a la superficie con carga negativa de las bacterias susceptibles e introducen una horquilla helicoidal hidrófoba en la membrana; la molécula sufre entonces una transformación de tipo "Dr. Jekyll y Mr. Hyde", se hace completamente hidrófoba y forma en la membrana un canal regulado por voltaje que mata la célula destruyendo su potencial energético. Incluso en este nivel la supervivencia es un juego difícil.

Si los microorganismos ingresan en el cuerpo, comienza a actuar el sistema inmunitario innato que incluye dos mecanismos defensivos principales: el efecto destructor de factores químicos solubles, como las enzimas bactericidas, y la **fagocitosis**, es decir, la ingestión por la célula (véase Avances y descubrimientos 1.1). Antes de analizar estas estrategias, consideremos primero el orden estereotípico de los acontecimientos que se producen con la infección.

Los comienzos de una respuesta inmunitaria

Un elemento importante en la iniciación de la respuesta inmunitaria es el **macrófago**. Estas células son relativamente abundantes en la mayoría de los tejidos (se aproxima al 10-15% del número total de células en algunas áreas del

Avances y descubrimientos 1.1— Fagocitosis

El perspicaz zoólogo ruso Elie Metchnikoff (1845-1916, Figura A1.1.1) descubrió que ciertas células especializadas median la defensa contra las infecciones microbianas (Figura A1.1.2), por lo cual puede ser considerado el padre del concepto general de inmunidad celular. Estaba intrigado por las células móviles de las larvas transparentes de estrella de mar y realizó la observación fundamental de que, pocas horas después de introducir en esas larvas una espina de rosa, ésta era rodeada por las células móviles. Un año después, en 1883, observó que las esporas de los hongos podían ser atacadas por las células sanguíneas de *Daphnia*, un diminuto metazoo transparente que se puede estudiar de manera directa con el microscopio. Metchnikoff extendió sus investigaciones a los leucocitos de mamíferos y demostró su capacidad de "engullir" microorganismos mediante un mecanismo que denominó **fagocitosis**. Como comprobó que este proceso era aún más eficaz en los animales que se recuperaban de una infección, llegó a la conclusión algo polarizada de que la fagocitosis brindaba la principal defensa, si no la única, contra las infecciones. Continuó con la definición de la existencia de dos tipos de fagocitos circulantes: el leucocito polimorfonuclear, al que denominó "micrófago", y el "macrófago", de mayor tamaño.

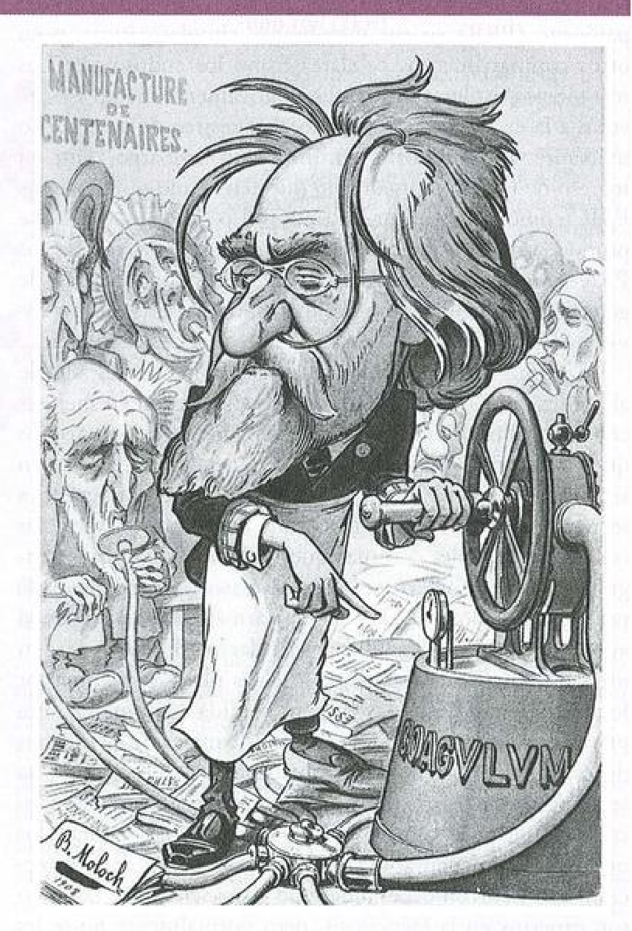


Figura A1.1.1. Caricatura del profesor Metchnikoff en *Chanteclair*, 1908, N° 4, p. 7. (Reproducción cedida por cortesía de The Wellcome Institute Library, Londres, Reino Unido).

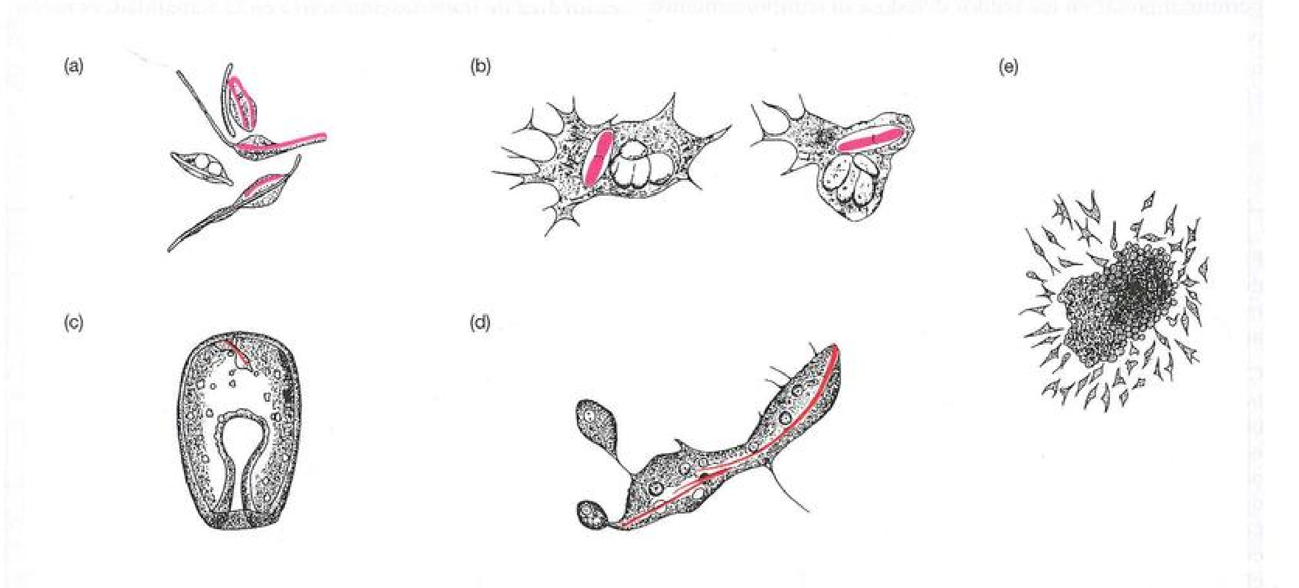


Figura A1.1.2. Reproducciones de algunas de las ilustraciones del libro de Metchnikoff, *Comparative Pathology of Inflammation* (1893). a) Cuatro leucocitos de rana con bacilos de carbunco en su interior; algunos están vivos y aparecen sin teñir, mientras que otros están muertos, han captado el colorante vesuvina y se tiñeron; b) dibujo de un bacilo de carbunco, teñido con vesuvina, en un leucocito de rana; las dos figuras representan dos fases del movimiento del mismo leucocito, que contiene bacilos de carbunco teñidos en la vacuola fagocítica; c) y d) cuerpo extraño (teñido) en una larva de estrella de mar rodeado por fagocitos fusionados para formar un plasmodio multinucleado, que se ve con mayor aumento en d); e) esta imagen permite apreciar la atracción dinámica de los fagocitos móviles del mesénquima hacia un intruso extraño dentro de una larva de estrella de mar.

cuerpo) y actúan como centinelas para el agente infeccioso a través de una serie de receptores de reconocimiento del patógeno (PRR) en sus membranas citoplasmáticas, y en otros compartimentos celulares como los endosomas. Los macrófagos tisulares son células relativamente inactivas, que están a la expectativa realizando el muestreo de su entorno mediante la fagocitosis continua. Sin embargo, ante el ingreso de un microorganismo que active uno o más de sus PRR (como un receptor de tipo Toll o de tipo NOD), se produce una transición sorprendente. La ocupación de los PRR sobre los macrófagos cambia según una batería de genes que los equipa para llevar a cabo una serie de funciones nuevas.

En primer lugar, los macrófagos se ponen en estado de alerta (es decir, se convierten en activos) y están en mejores condiciones para endocitar y destruir a los microorganismos que encuentran (esto se tratará en detalle en la sección siguiente). En segundo lugar, los macrófagos comienzan a secretar citocinas y quimiocinas que tienen efectos sobre las células endoteliales cercanas que revisten los capilares sanguíneos; esto convierte a los capilares en este ámbito más permeables de lo que ellos serían normalmente. A su vez, el aumento de la permeabilidad vascular permite que se den otras dos circunstancias. Las proteínas plasmáticas que por lo general están limitadas en gran medida a la sangre ahora pueden invadir el tejido en el punto de infección, y muchas de estas proteínas tienen propiedades microbicidas. Una segunda consecuencia del aumento de la permeabilidad vascular es que otro tipo de células inmunitarias innatas, los **neutrófilos**, pueden ahora tener acceso al sitio de la infección. Los neutrófilos, al igual que los macrófagos, también son expertos en la fagocitosis, pero normalmente no se les permite ingresar en los tejidos debido a su comportamiento potencialmente destructivo. Tras el ingreso en un tejido infectado, los neutrófilos activados prosiguen para atacar y fagocitar los microorganismos que encuentran. Analizaremos algunos de estos acontecimientos con mayor detalle.

Los receptores de reconocimiento de patrón (PRR) de las células fagocíticas reconocen y son activados por patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP)

Dado que la capacidad de distinguir un amigo de un enemigo es de importancia fundamental para cualquier fagocito que se precie de tal, estas células están repletas de receptores capaces de reconocer diferentes PAMP. Varios de estos receptores de reconocimiento de patrones se parecen a las lectinas y se unen de modo multivalente con considerable especificidad a los azúcares expuestos de la superficie microbiana, con sus características configuraciones geométricas tridimensionales rígidas. No se unen de una manera apreciable a los grupos de galactosa o ácido siálico, que suelen ser los azúcares último y penúltimo de los polisacáridos de superficie de los mamíferos, de modo tal que proporcionan las bases moleculares para diferenciar entre las células propias y las microbianas no propias. Otros PRR detectan ácidos nucleicos provenientes de los genomas bacterianos y virales en virtud de las modificaciones que no suelen encontrarse en los ácidos nucleicos de los vertebrados o las conformaciones que normalmente no se encuentran en el citoplasma (p. ej., RNA bicatenario). Los PRR constituyen un grupo diverso de receptores que puede subdividirse en al menos 5 familias separadas (TLR, CTLR, NLR, RLR y receptores depuradores) según sus características estructurales. En cada clase también existen varios receptores con el resultado de que más de 50 PRR diferentes pueden expresarse en un fagocito en un momento dado. Como este tema es un área de investigación activa en la actualidad, es probable que en un futuro próximo se identifiquen muchos otros PRR. Ahora analizaremos con mayor detalle las 5 familias conocidas de PRR.

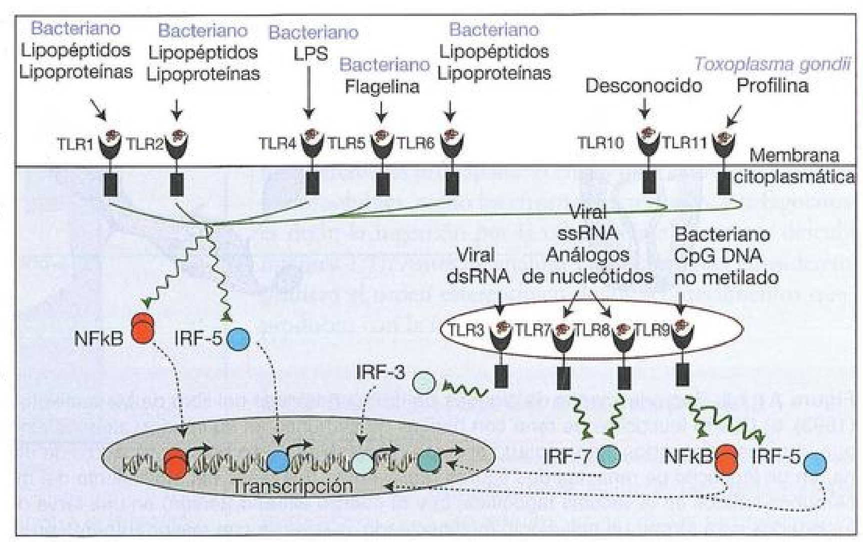


Figura 1.7. Una familia de receptores de tipo Toll (TLR) actúa como sensores para los patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP).

Como se muestra, los TLR residen dentro de los compartimentos de la membrana citoplasmática o de la membrana endosómica. Con la ocupación del ectodominio del TLR con un PAMP apropiado (se muestran algunos ejemplos), las señales se propagan en el interior de la célula que activan los factores de transcripción, como el factor nuclear κB (NFκB), el factor regulado por interferón (IRE) o ambos. Entonces, los factores de transcripción NFκB e IRF dirigen la expresión de numerosos productos génicos antimicrobianos, como citocinas y quimiocinas, así como proteínas que están implicadas en alterar el estado de activación de la célula.

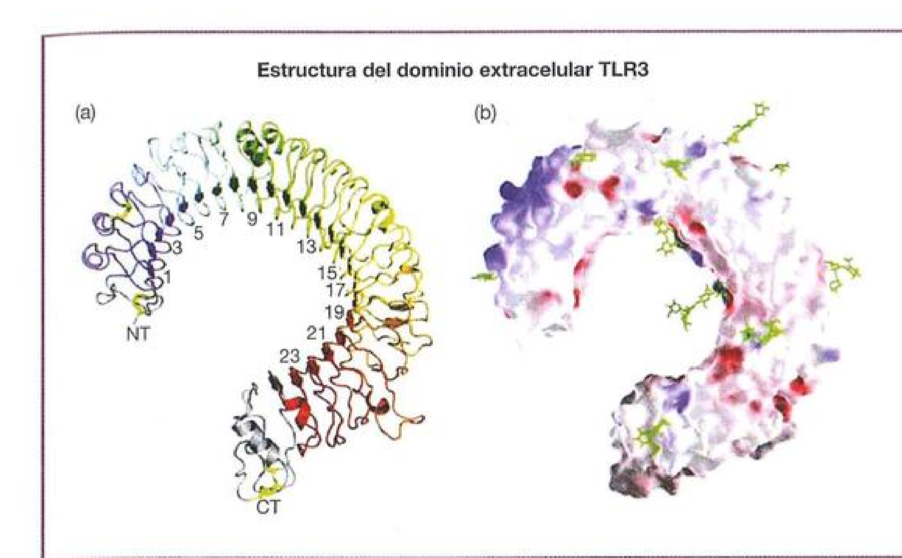


Figura 1.8. Estructura del receptor de tipo Toll (TLR).

Estructura del ectodominio TLR3. a) Diagrama de cinta del ectodominio TLR3. Las repeticiones con alto contenido de leucina (LRR; *leucine-rich repeats*) están coloreadas de azul a rojo que comienza en LRR1 y sigue hasta a LRR23, como se indica. NT, N-terminal; CT, C-terminal. b) El potencial electrostático de superficie muestra cargas positivas (azul) y negativas (rojo) a pH neutro. Los glucanos ligados a N se muestran como esferas y varillas verdes. (Reproducido de Bell J.K. et al. [2005] *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **102**, 10976-10980, con autorización).

Receptores de tipo Toll (TLR)

Un subconjunto importante del PRR pertenece a la clase de los denominados **receptores de tipo Toll** (TLR) por su similitud con el receptor Toll de la mosca de la fruta, *Drosophila*, que en el adulto activa una cascada intracelular que da lugar a la expresión de péptidos antimicrobianos en respuesta a la infección microbiana. Se han identificado varios TLR de la superficie celular que actúan como sensores de las infecciones extracelulares (Figura 1.7) y que son activados por elementos microbianos como peptidoglucano, lipoproteínas, lipoarabinomanano micobacteriano, zimosán de levaduras y flagelina, y otros ligandos derivados del patógeno.

Si bien se presentan muchos TLR en la superficie celular algunos, como TLR3 y TLR7/8/9 que responden al RNA viral intracelular y al DNA bacteriano no metilado, se ubican en los endosomas y son ocupados tras el encuentro con el material fagocitado (Figura 1.7). La ocupación de los TLR con sus respectivos ligandos dirige la activación del factor nuclear κB (NFκB) y de varios miembros de la familia de factores de transcripción regulados por interferón (IRF), que dependen del TLR específico. También es posible la activación combinatoria de los TLR, por ejemplo el TLR2 es capaz de responder ante una amplia diversidad de PAM y en general actúa dentro de complejos heterodiméricos TLR2/TLR1 o TLR2/TLR6.

Todos los TLR tienen las mismas características estructurales básicas, con varias repeticiones N-terminal con alto contenido de leucina (LRR; *leucine-rich repeats*) dispuestas en una estructura en forma de herradura o de media luna solenoide que actúa como el dominio de unión al PAMP (Figura 1.8). Tras la unión de un PAMP, los TLR transducen las señales al interior de la célula a través de los motivos C terminales denominados dominios IR, que pueden reclutar proteínas adaptadoras en el citoplasma (como MyD88 o Mal) que tienen motivos TIR similares. Estas proteínas adaptadoras propagan la señal en sentido anterógrado y culminan en la activación de los factores de transcripción de las familias NFκB e IRF (Figuras 1.7 y 1.9).

Receptores de lectina de tipo C (CTLR, C-type lectin receptors)

Los fagocitos también despliegan otro conjunto de PRR de unión celular, las **lectinas de tipo C (dependientes del calcio)**, entre las que puede citarse como ejemplo el receptor para manosa del macrófago. Estas proteínas transmembrana tienen múltiples dominios de reconocimiento de hidratos de carbono cuya ocupación con sus PAMP microbianos relacionados genera una señal de activación intracelular. La familia CTLR es muy diversa y los ligandos para muchos receptores de esta categoría siguen siendo temas de investigaciones en curso.

Receptores de tipo NOD (NLR, NOD-like receptors)

En cuanto se detectan los agentes infecciosos que han logrado acceder al interior de una célula, los productos microbianos pueden ser reconocidos por los receptores denominados NOD. A diferencia de los TLR y los CTLR, que residen en la membrana citoplasmática o en los compartimentos membranosos intracelulares, los NLR son proteínas solubles que residen en el citoplasma donde también actúan como receptores para patrones moleculares derivados del patógeno. Aunque una familia diferente de receptores, los NLR, contienen típicamente un motivo de interacción de proteína-proteína N-terminal que permite que estas proteínas recluten proteasas o cinasas tras la activación, seguido por un dominio de oligomerización central y repeticiones con alto contenido de leucina C-terminal (LRR) que parece actuar como sensor para los productos del patógeno. Se considera que los NLR existen en un estado de autoinhibición con sus dominios N-terminales plegados de nuevo sobre sus LRR C-terminales, una confirmación que impide la interacción de la región N-terminal con sus patrones de unión en el citoplasma. La activación de estos receptores es más probable que se desencadene a través de la unión directa de un PAMP al C-terminal de los LRR, que tiene el efecto de interrumpir la interacción entre las terminaciones N y C del NLR. Esto permite también la oligomerización en un

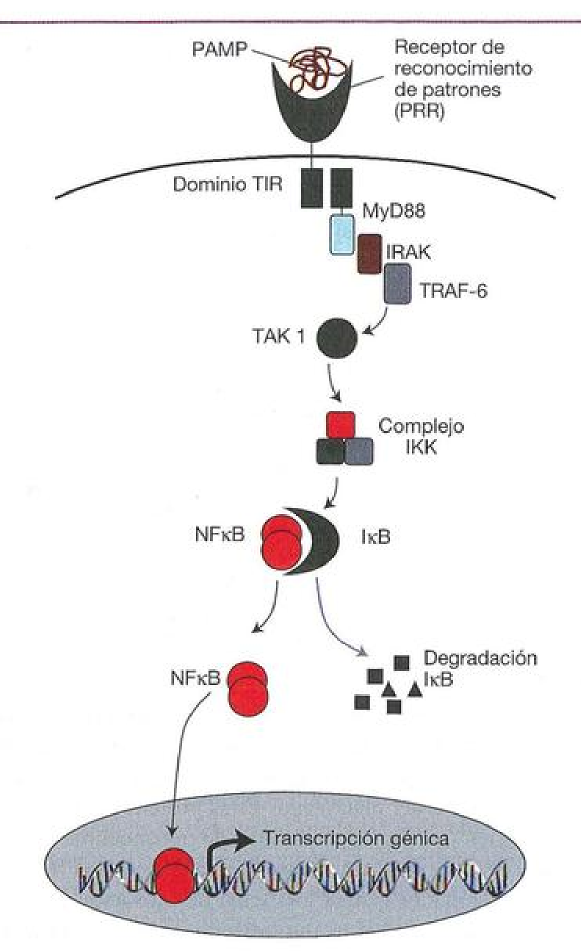


Figura 1.9. Los receptores de tipo Toll estimulan la transcripción dependiente de NFκB a través de la activación del complejo 1κB cinasa (IKK).

Con la interacción de un TLR con su ligando apropiado, se reclutan varias proteínas adaptadoras (como se muestra) en el receptor TLR (de tipo Toll) y en el dominio del receptor de tipo IL-1 (TIR). En conjunto, estas proteínas activan el complejo IKK, que a su vez fosforila el inhibidor de NFκB (IκB), una proteína que se une y fija NFκB en el citosol. La fosforilación de IκB dirige a este último para la degradación y libera NFκB que puede ser entonces translocado al interior del núcleo e inicia la transcripción de múltiples genes.

complejo que ahora es capaz de reclutar una cinasa que activa NFκB (como RIP-2) o miembros de la familia caspasas de las proteasas que por proteólisis pueden procesar y activar el precursor IL-1β en la citocina madura y biológicamente activa. Este último complejo, llamado **inflamasoma**, se ensambla en respuesta a una serie de PAMP y es importante para la producción de IL-1β, así como IL-18.

Receptores de helicasa similares a RIG (RLR, RIG-like helicase receptors)

Las helicasas similares a RIG constituyen un grupo de proteínas recién descubiertas que actúan como sensores intracelulares para los productos virales. Al igual que los NLR, los RLR se encuentran en el citoplasma y al parecer todos se activan en respuesta al RNA bicatenario y son capaces de dirigir la activación de NFκB e IRF3/4 que, en cooperación, inducen los interferones antivirales de tipo 1 (IFNα y β).

Receptores depuradores

Los receptores depuradores (*scavenger receptors*) representan aún una clase adicional de receptores fagocíticos que reconocen una diversidad de polímeros aniónicos y proteínas acetiladas de baja densidad. Merece alguna atención la función de la molécula depuradora CD14 en el tratamiento del LPS (endotoxina lipopolisacárida) de las bacterias gramnegativas debido a que, en caso contrario, se puede producir un *shock* séptico. La porción de lípido A biológicamente reactiva del LPS es reconocida por una proteína plasmática de unión al LPS y el complejo, que es capturado por la molécula depuradora CD14 en la célula fagocítica, activa el TLR4.

La ocupación del receptor de reconocimiento de patrón (PRR) causa la activación y la producción de citocinas proinflamatorias

Tras el encuentro con los ligandos de cualquiera de los PRR mencionados, el resultado final es un cambio en el comportamiento celular de un estado inactivo a uno activo. Los macrófagos y los neutrófilos activados son capaces de fagocitar partículas que ocupan sus PRR, y en este estado también liberan una serie de citocinas y quimiocinas que amplifican aún más la respuesta inmunitaria.

Como se señaló, la ocupación de muchos de los PRR mencionados resulta en una cascada de señales de transducción que culmina con la activación del NFκB, un factor de transcripción que controla la expresión de numerosas moléculas importantes desde el punto de vista inmunitario, como citocinas y quimiocinas (Figuras 1.7 y 1.9). En las células en reposo, NFκB es secuestrado en el citoplasma por su inhibidor IκB, que enmascara una señal de localización nuclear en el primero. Después de la unión de un PAMP con su cognado PRR se libera NFκB a partir de IκB debido a las acciones de una cinasa que fosforila IκB y promueve su destrucción. NFκB ahora está libre para translocarse al núcleo, buscar sus genes diana e iniciar la transcripción (Figura 1.9).

También se activan en sentido anterógrado otras cascadas de factores de transcripción del PRR, sobre todo los **factores regulados por interferón** (IRF) (Figura 1.7). Algunos de los mediadores inflamatorios más importantes sintetizados y liberados en respuesta a la ocupación del PRR incluyen los interferones antivirales (véase p. 25), las pequeñas proteínas citocinas, como interleucina-1β (IL-1β), IL-6, IL-12 y el factor de necrosis tumoral α (TNFα) (véase p. 229), que activan otras células a través de la unión a receptores específicos y quimiocinas, como IL-8, que representan un subconjunto de citocinas quimiotácticas. En conjunto, estas moléculas amplifican más la respuesta inmunitaria y tienen efectos en los capilares sanguíneos locales, que permiten la extravasación de los neutrófilos que acuden rápidamente al tejido para ayudar a los macrófagos a tratar la situación.

Las células muertas también liberan moléculas capaces de ocupar los PRR

Como se mencionó, las células que sufren necrosis (pero no apoptosis) también son capaces de liberar moléculas (p. ej., DAMP) que pueden ocupar los PRR (Figura 1.3). Recién se está conociendo la identidad de estas moléculas, pero comprenden HMGB1, miembros de la familia de la proteína S100 que se unen al calcio, HSP60 y las citocinas clásicas IL-Iα e IL-33. Al parecer, ciertos DAMP pueden unirse a miembros de la familia TLR (p. ej., se sugirió que HMGB1 señala la vía TLR4), mientras que otras, como IL-lα e IL-33 se unen de modo específico a los receptores de la superficie celular que poseen motivos de señalización intracelulares similares a los receptores TLR.

Los DAMP participan en la amplificación de las respuestas inmunitarias contra los agentes infecciosos que provocan muerte celular y también intervienen en el fenómeno de **lesión estéril**, en la que la respuesta inmunitaria se produce en ausencia de cualquier agente infeccioso discernible (p. ej., la contusión que sucede en respuesta a una lesión por compresión en la que no hay solución de continuidad de la barrera cutánea representa una respuesta inmunitaria innata). De hecho, Polly Matzinger propuso que las respuestas inmunitarias intensas sólo se observan cuando se detecta un elemento no propio en combinación con el daño tisular (es decir, una fuente de DAMP). Aquí se supone que el sistema inmunitario no necesita responder si un agente infeccioso no está causando daño alguno. Por lo tanto, los PAMP y los DAMP pueden actuar de modo sinérgico para provocar respuestas inmunitarias más intensas y eficaces que lo que podría suceder en respuesta a cada uno de ellos por separado.

Las células fagocíticas endocitan y destruyen los microorganismos

Los neutrófilos y los macrófagos son fagocitos "profesionales" dedicados

La endocitosis y la digestión de microorganismos son procesos asignados a dos tipos celulares principales, a los que Elie Metchnikoff denominó, a fines del siglo XIX, micrófagos y macrófagos.

El macrófago

Estas células derivan de los promonocitos de la médula ósea que, tras su diferenciación en monocitos sanguíneos (Figura 1.10a), se instalan por último en los tejidos como macrófagos maduros, donde constituyen el **sistema fagocítico mononuclear** (Figura 1.11). Se encuentran en el tejido conectivo y alrededor de la membrana basal de los vasos sanguíneos de pequeño calibre, aparecen en mayor concentración en los pulmones (Figura 1.10h; macrófagos alveolares), el hígado (células de Kupffer) y en el revestimiento de los sinusoides esplénicos y los senos medulares de los ganglios linfáticos, donde ocupan localizaciones estratégicas para filtrar y eliminar el material extraño. Otros ejemplos son las células mesangiales del glomérulo renal, la microglía del encéfalo y los osteoclastos de los huesos. A diferencia de los polimorfonucleares, son células de vida prolongada, con cantidades significativas de retículo endoplasmático rugoso y mitocondrias. Mientras los polimorfonucleares constituyen la principal defensa contra las bacterias piógenas (formadoras de pus), en general se puede decir que los macrófagos están más preparados para combatir las bacterias (Figura 1.10g), los virus y los protozoos capaces de vivir dentro de las células del huésped.

El polimorfonuclear neutrófilo

Esta célula, la más pequeña de las dos, comparte con los demás elementos corpusculares de la sangre un precursor común, la célula madre hematopoyética, y es el leucocito dominante en el torrente sanguíneo. Es una célula de vida media corta, que no se divide, con un núcleo multilobulado y numerosos gránulos (Figura 1.12) que casi no se tiñen con los colorantes histológicos (como hematoxilina y eosina), a diferencia de las estructuras del eosinófilo y el basófilo, estrechamente relacionados con el neutrófilo (Figura 1.10c y 1.10i). Los gránulos neutrófilos son de dos tipos principales: a) el **gránulo primario azurófilo** se forma al principio del desarrollo (Figura 1.10e), presenta la típica morfología lisosómica, y contiene mieloperoxidasa y la mayoría de los efectores antimicrobianos no oxidativos, como defensinas, proteína bactericida estimuladora de la permeabilidad (BPI) y catepsina G (Figura 1.12); b) los **gránulos secundarios específicos** peroxidasa negativos que contienen lactoferrina, gran parte de la lisozima, fosfatasa alcalina (Figura 1.10d) y citocromo b_{558} unido a membrana (Figura 1.12). Los abundantes depósitos de glucógeno se utilizan en la glucólisis, lo cual les permite a las células actuar en condiciones de anaerobiosis.

Los microorganismos son ingeridos por células fagocíticas activadas

Tras la adherencia del microorganismo a la superficie del neutrófilo o del macrófago a través del reconocimiento de un PAMP (Figura 1.13.2), la señal obtenida (Figura 1.13.3) inicia la fase de ingestión mediante la activación de un sistema contráctil de actina-miosina que extiende seudópodos alrededor de la partícula (Figuras 1.13.4 y 1.14). Cuando se adhieren de modo secuencial receptores adyacentes a la superficie del microorganismo, la membrana citoplasmática es traccionada alrededor de la partícula en forma similar a una "cremallera", hasta incluirla completamente en una vacuola (fagosoma; Figuras 1.13.5 y 1.14). Los procesos se suceden a continuación con eficiencia y al cabo de un minuto los gránulos citoplasmáticos se fusionan con el fagosoma y liberan sus contenidos alrededor del microorganismo capturado (Figuras. 1.13.7 y 1.15), que es sometido a la acción de una serie extraordinaria de mecanismos bactericidas.

Hay un amplio espectro de mecanismos de destrucción

Destrucción por especies reactivas del oxígeno

Para el invasor, el problema comienza en el momento en que se inicia la fagocitosis. Hay un notable incremento en la

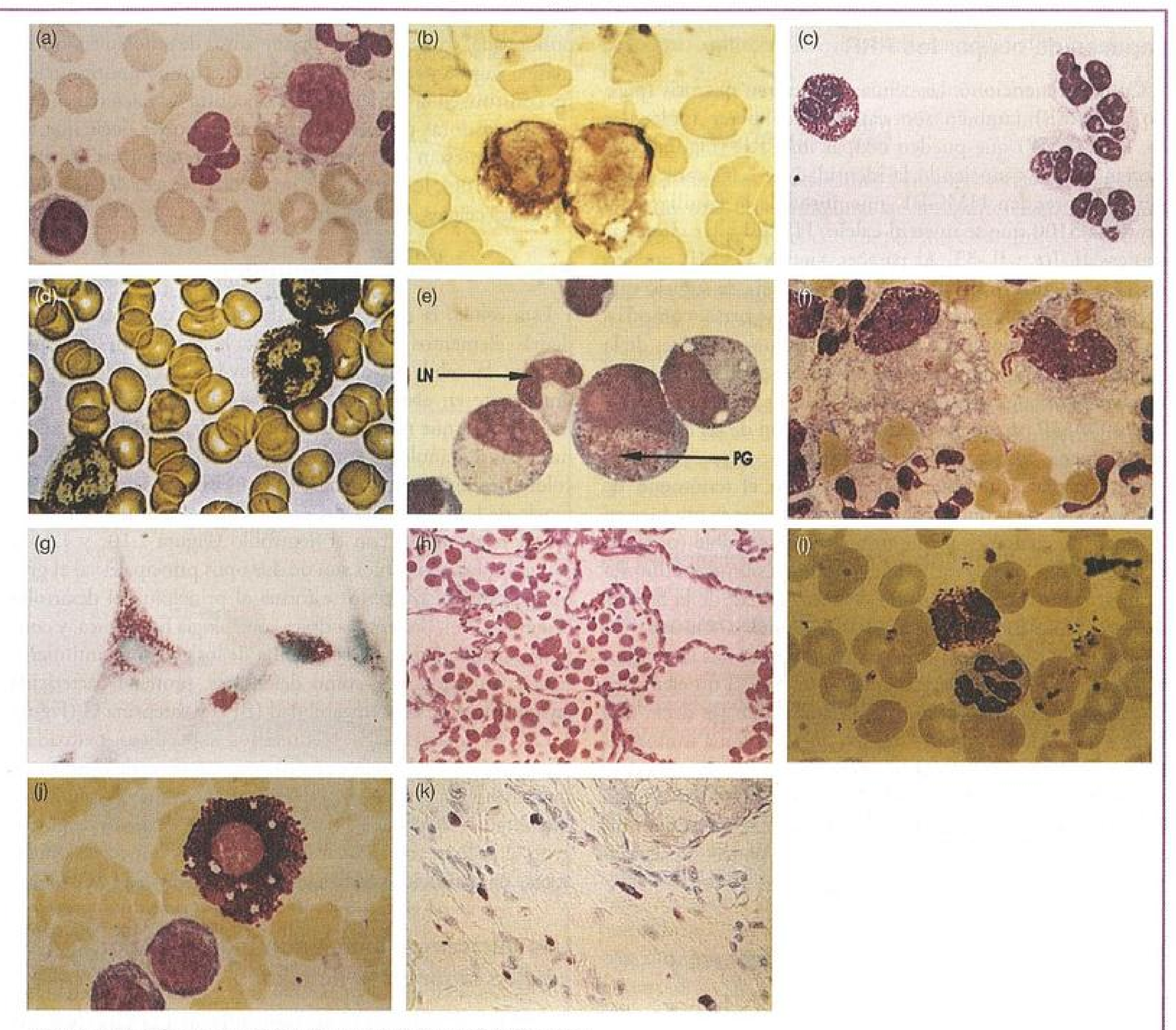


Figura 1.10. Células que intervienen en la inmunidad innata.

a) Monocito que muestra el núcleo "en herradura" y el citoplasma pálido, moderadamente abundante. Obsérvense los tres neutrófilos polimorfonucleares multilobulados y el linfocito pequeño (ángulo inferior izquierdo). Tinción de Romanowsky. b) Dos monocitos teñidos para esterasa no específica mediante α-naftil acetato. Se aprecia el citoplasma vacuolado. La pequeña célula con tinción focal en la parte superior es un linfocito T. c) Cuatro leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos) y un eosinófilo. Se distinguen con claridad los núcleos multilobulados y los gránulos citoplasmáticos; los del eosinófilo presentan una tinción muy intensa. d) Neutrófilo polimorfonuclear con gránulos citoplasmáticos teñidos para fosfatasa alcalina. e) Neutrófilos tempranos en médula ósea. Los gránulos primarios azurófilos (PG), en principio agrupados cerca del núcleo, se desplazan hacia la periferia, donde los gránulos neutrófilos específicos son formados por el aparato de Golgi a medida que la célula madura. El núcleo se torna gradualmente lobular (LN). Giemsa. f) Células inflamatorias del sitio de una hemorragia cerebral, con un gran macrófago activo en el centro que contiene eritrocitos fagocitados y vacuolas destacadas. A la derecha se observa un monocito con núcleo en herradura y cristales de bilirrubina (hematoidina) en el citoplasma. Se distinguen con claridad varios neutrófilos multinucleados. Giemsa. g) Macrófagos en cultivos en monocapa tras la fagocitosis de micobacterias (teñidas de rojo). Carbolfucsina con tinción de contraste de verde de malaquita. h) Numerosos macrófagos alveolares grandes en espacios aéreos dentro del pulmón. i) Basófilo con gránulos intensamente teñidos, comparado con un neutrófilo (abajo). j) Mastocito de médula ósea. Núcleo central redondo rodeado por grandes gránulos oscuros. En la parte inferior se muestran dos pequeños precursores de eritrocitos. Tinción de Romanowsky. k) Mastocitos tisulares en la piel, teñidos con azul de toluidina. Los gránulos intracelulares son metacromáticos y se tiñen de color púrpura rojizo. Obsérvese la agrupación cerca de los capilares dérmicos. (Los frotis de los que se reprodujeron las ilustraciones a), b), d), e), f), i) y j) fueron gentilmente cedidas por el señor M. Watts, del Departamento de Hematología del Middlesex Hospital Medical School; c) cortesía del profesor J.J. Owen; g) de los profesores P. Lydyard y G. Rook, h) del doctor Meryl Griffiths y k) del profesor N. Woolf).

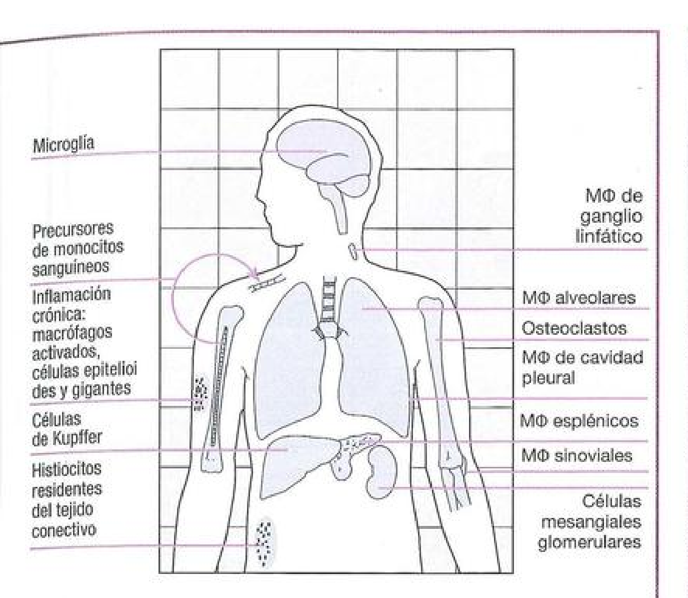
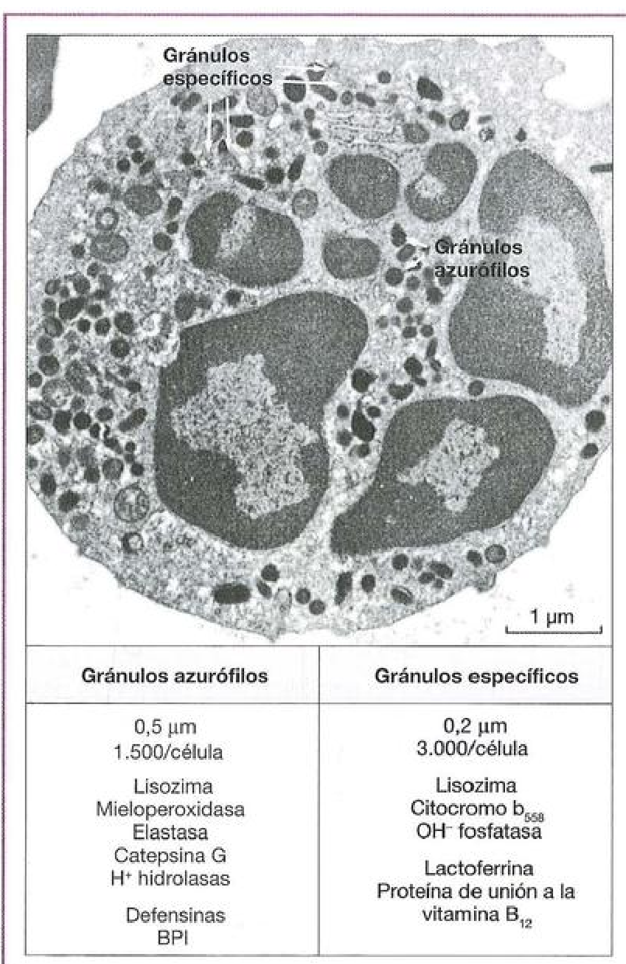


Figura 1.11. Sistema fagocítico mononuclear.

Los precursores promonocitos de la médula ósea evolucionan a monocitos de la sangre circulante, que luego se distribuyen por todo el organismo como macrófagos maduros (Mφ), según se muestra. La otra célula fagocítica importante, el neutrófilo polimorfonuclear, está en su mayor parte confinado al torrente sanguíneo, salvo cuando es reclutado en los sitios de inflamación aguda.



Gránulos azurófilos	Gránulos específicos
0,5 µm 1.500/célula Lisozima Mieloperoxidasa Elastasa Catepsina G H^+ hidrolasas Defensinas BPI	0,2 µm 3.000/célula Lisozima Citocromo b_{558} OH^- fosfatasa Lactoferrina Proteína de unión a la vitamina B_{12}

Figura 1.12. Ultraestructura del neutrófilo.

Se distinguen bien el núcleo multilobulado y los dos tipos principales de gránulos citoplasmáticos. (Cortesía del doctor D. McLaren).

actividad de la desviación de la hexosa monofosfato, que genera menor cantidad del nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH). Los electrones pasan desde NADPH a una flavoproteína de membrana que contiene flavina adenina dinucleótido (FAD) y luego a un **citocromo (cit b_{558})** de la membrana citoplasmática singular. Éste tiene un potencial de oxidorreducción de punto medio muy bajo de –245 mV, lo cual le permite reducir el oxígeno molecular directamente a anión superóxido (Figura 1.16a). Por lo tanto, la reacción clave catalizada por esa NADPH oxidasa, que inicia la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO), es la siguiente:

$$NADPH + O_2 \rightarrow NADP^+ + \cdot O_2^-$$
(anión superóxido).

El anión superóxido se convierte en peróxido de hidrógeno bajo la influencia de la superóxido dismutasa y, más tarde, en radicales oxhidrilo (•OH). Cada uno de estos productos tiene notable reactividad química y una amplia variedad de dianas moleculares, por lo cual son agentes antimicrobianos extraordinarios; en particular, el •OH es uno de los radicales libres más reactivos que se conocen. Además, la combinación de peróxido, mieloperoxidasa y iones haluro constituye un poderoso sistema halogenante, capaz de destruir bacterias y virus (Figura 1.16a). Si bien el H_2O_2 y los compuestos halogenados no son tan activos como los radicales libres, tienen más estabilidad y por ello se difunden mejor y, en consecuencia, son tóxicos para los microorganismos en las inmediaciones extracelulares.

Destrucción por especies reactivas del nitrógeno

El óxido nítrico surgió como un mediador fisiológico destacado cuando se demostró que era idéntico al factor de relajación derivado del endotelio. Se ha demostrado que ésta es sólo una de sus numerosas funciones (aunque parezca asombroso, también actúa en la erección del pene), pero en este contexto tiene mayor interés su formación por una NO· sintasa inducible (iNOS) dentro de la mayoría de las células, pero sobre todo en macrófagos y neutrófilos humanos, por lo cual crea un poderoso sistema antimicrobiano (Figura 1.16b).

Mientras que la NADPH oxidasa tiene la función de destruir microorganismos extracelulares, captados por fagocitosis y atrapados dentro de la vacuola fagocítica, el mecanismo NO· puede actuar contra agentes que invaden el citosol; por lo tanto, no sorprende que la mayoría de las células no fagocíticas, capaces de ser infectadas por virus y otros parásitos, estén dotadas de capacidad iNOS. El mecanismo de acción puede ser a través de la degradación de los grupos prostéticos Fe-S de determinadas enzimas transportadoras de electrones, la disminución de hierro y la producción de

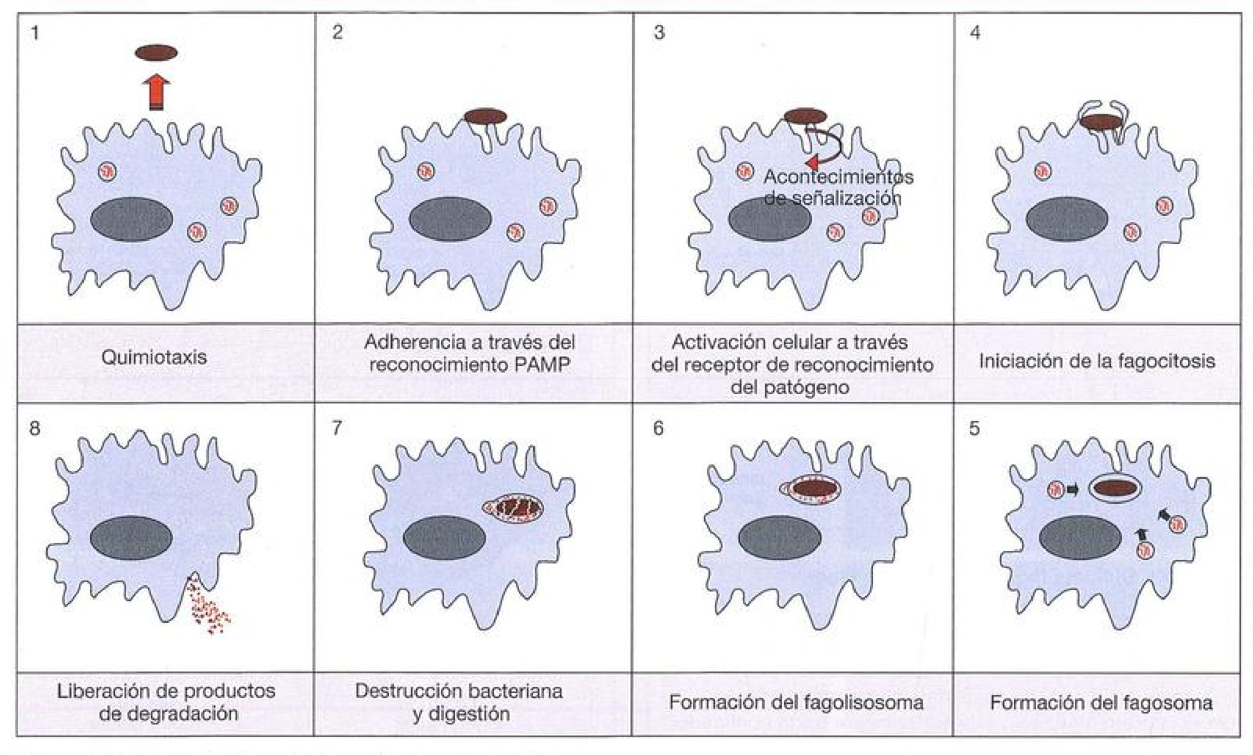
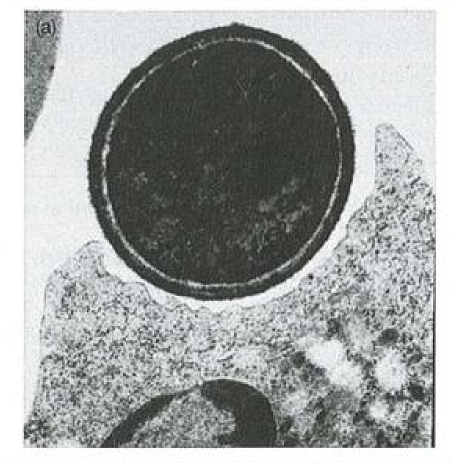


Figura 1.13. Fagocitosis y destrucción de una bacteria.

Estadios 3/4, estallido respiratorio y activación de NADPH oxidasa; estadio 5, daño por especies reactivas del oxígeno; estadios 6/7, daño por acción de peroxidasa, proteínas catiónicas, defensinas peptídicas antibióticas, lisozima y lactoferrina.



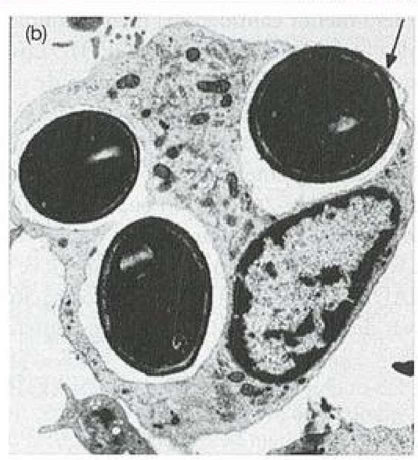


Figura 1.14. Adherencia y fagocitosis.

a) Fagocitosis de *Candida albicans* por un leucocito polimorfonuclear (neutrófilo). La adherencia al manano de la superficie de la pared de la levadura inicia la inclusión de la partícula fúngica dentro de los "brazos" citoplasmáticos. Los gránulos lisosómicos son abundantes, pero hay escasas mitocondrias (×15.000). b) Fagocitosis de *C. albicans* por un monocito, donde se muestra la formación casi completa del fagosoma (flechas) alrededor de un microorganismo y la ingestión completa de otros dos (×5.000). (Cortesía del doctor H. Valdimarsson).

radicales ·ONOO tóxicos. En la actualidad se sabe que el gen *N-ramp*, relacionado con la resistencia a microorganismos como el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), *Salmonella* y *Leishmania* (capaces de vivir en un hábitat intracelular), expresa una proteína que forma un canal de transmembrana susceptible de intervenir en el transporte de NO· a través de las membranas de los lisosomas.

Destrucción por antimicrobianos preformados (Figura 1.16c)

Estas moléculas, contenidas en los gránulos de los neutrófilos, entran en contacto con el microorganismo ingerido cuando tiene lugar la fusión con el fagosoma. La dismutación del superóxido consume los iones hidrógeno y eleva ligeramente el pH de la vacuola, lo cual permite el funcionamiento óptimo de la familia de proteínas y péptidos catiónicos. Éstos se conocen como **defensinas**, pesan 3,5-4 kDa y siempre tienen un alto contenido de arginina, que en el fagosoma alcanza concentraciones increíblemente elevadas, del orden de 20-100 mg/mL. Al igual que las colicinas bacterianas recién descritas, su estructura anfipática les permite insertarse en las membranas microbianas para formar canales iónicos regulados por voltaje desestabilizantes (cabe preguntarse "quién" copió a "quién"). En concentra-

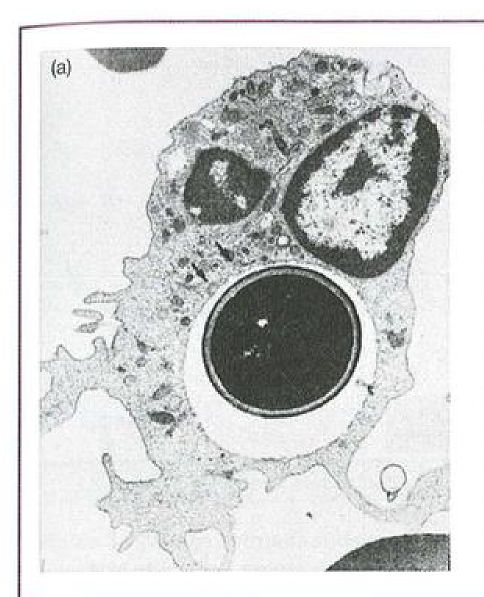




Figura 1.15. Formación del fagolisosoma.

a) Neutrófilo 30 minutos después de la ingestión de *C. albicans.* El citoplasma ya está desgranulado en parte y dos gránulos de lisosoma (flechas) se fusionan con la vacuola fagocítica. Se destacan dos lóbulos del núcleo (×5.000). b) Imagen con mayor aumento de a), en la que se observan gránulos fusionados que vuelcan su contenido en la vacuola fagocítica (flechas) (×33.000). (Cortesía del doctor H. Valdimarsson).

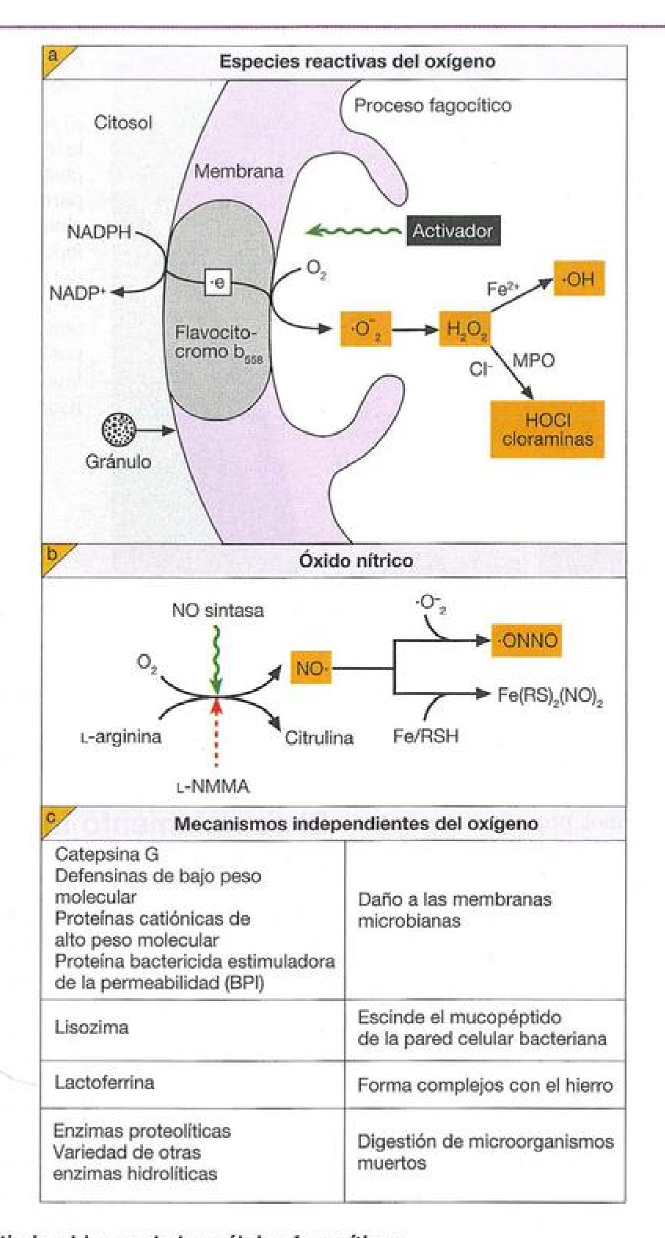
ciones de 10-100 µg/mL, estos péptidos antibióticos actúan como desinfectantes contra un amplio espectro de bacterias grampositivas y gramnegativas, muchos hongos y varios virus provistos de envoltura. Muchos muestran una notable selectividad para los microorganismos procariontes y eucariontes en relación con las células huésped, que en parte depende de la diferente composición lipídica de las membranas. Impresiona la capacidad de esta herramienta de una simpleza sorprendente para diferenciar grandes clases de células no propias (o sea, los microorganismos) de lo propio.

Como si esto no fuera suficiente, las membranas bacterianas son lesionadas además por la acción de una proteinasa neutra (catepsina G) y por la transferencia directa a la superficie microbiana de la BPI, lo cual incrementa la permeabilidad bacteriana. El pH bajo, la lisozima y la lactoferrina constituyen factores bactericidas o bacteriostáticos, independientes del oxígeno, que pueden actuar en condiciones de anaerobiosis. Es interesante destacar que la lisozima y la lactoferrina tienen acción sinérgica. Por último, los microorganismos muertos son digeridos por enzimas hidrolíticas, y los productos de degradación se liberan al exterior (Figura 1.13.8).

El lector puede estar abrumado por el impresionante potencial antimicrobiano de las células fagocíticas. Pero hay algunos problemas; nuestro formidable arsenal es inútil a menos que el fagocito pueda: a) ser "atraído" por el microorganismo, b) adherirse a éste, y c) responder mediante la activación de la membrana que inicia la fagocitosis. Algunas bacterias producen sustancias químicas, como el péptido formil.Met.Leu.Phe, que atraen y dirigen los leucocitos a través de un proceso denominado **quimiotaxis**; muchos microorganismos se adhieren a la superficie del fagocito y muchos generan espontáneamente la señal adecuada de iniciación de membrana. Sin embargo, nuestros abundantes adversarios microbianos sufren mutaciones permanentes que generan nuevas especies capaces de superar las defensas mediante la producción de compuestos diferentes de los mencionados. Cabe entonces preguntarse qué hacer. El cuerpo ha resuelto estos problemas con la facilidad natural que proviene de varios millones de años de evolución mediante el desarrollo del sistema del **complemento**.

El complemento facilita la fagocitosis y la lisis bacteriana 

El sistema complemento comprende un conjunto complejo de alrededor de 20 proteínas plasmáticas que se activan de una manera en cascada tras la unión con ciertos polisacáridos microbianos que normalmente no están presentes en los vertebrados, pero que se los suele hallar en las membranas bacterianas. Muchos de los factores del complemento son proteasas que en un inicio se producen como precursores inactivos y se activan a través de la detección de PAMP, donde cada proteasa activa a la siguiente en la cadena. La activación del complemento puede dar como resultado la unión de éste a las superficies de la célula bacteriana (que en la jerga de la inmunología se denomina **opsonización**), que puede aumentar en gran medida su captación por los fagocitos. El depósito de los factores del complemento sobre su superficie también puede producir la **lisis directa** de una bacteria que ha tenido la desgracia de activar esta cascada. Igual de importante es que ciertos fragmentos del complemento producidos como subproductos de su activación pueden actuar como **factores quimiotácticos** para guiar las células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos) hacia la desventurada bacteria, lo que da por resultado su captura a través de la fagocitosis. Estos últimos factores del complemento también pueden **activar los mastocitos locales** (que analizaremos enseguida) para liberar moléculas que ayudan a reclutar neutrófilos y otras células del sistema inmunitario hacia el sitio de infección, a través del aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos locales. En ambos casos, la activación del complemento augura problemas para nuestro pequeño enemigo bacteriano. Debido a las muchas proteínas implicadas, el estudio del sistema del



Catepsina G Defensinas de bajo peso molecular Proteínas catiónicas de alto peso molecular Proteína bactericida estimuladora de la permeabilidad (BPI)	Daño a las membranas microbianas
Lisozima	Escinde el mucopéptido de la pared celular bacteriana
Lactoferrina	Forma complejos con el hierro
Enzimas proteolíticas Variedad de otras enzimas hidrolíticas	Digestión de microorganismos muertos

Figura 1.16. Mecanismos antimicrobianos de las células fagocíticas.

a) Producción de intermediarios reactivos del oxígeno. Los electrones provenientes de NADPH son transferidos por la enzima flavocitocromo oxidasa al oxígeno molecular para formar las especies moleculares microbicidas que se muestran en los recuadros anaranjados. (Para los más estudiosos: el agente que desencadena la fagocitosis se une a un receptor transmembrana de siete dominios, ligado a proteína G clásica, que activa una proteína de unión al trifosfato de guanosina [GTP] intracelular. A su vez, esta última proteína activa un conjunto de enzimas: la fosfoinositol-3-cinasa, que interviene en la reorganización citoesquelética subyacente a las respuestas quimiotácticas [p. 16], la fosfolipasa-Cγ2, que media los procesos tendientes a la desgranulación lisosómica y la fosforilación de phox p47 a través de la activación de la proteincinasa C y de los sistemas de cinasas MEK y MAP [véase Figura 8.8], que controlan el ensamble de la NADPH oxidasa. Esta enzima está compuesta por el citocromo b_{558} de la membrana, que consiste en una proteína hémica p21 ligada a gp91 con sitios de unión para NADPH y FAD en su cara intracelular, donde se translocan p47 y p67 fosforiladas desde el citosol al activarse la oxidasa). b) Generación de óxido nítrico. La enzima, que estructuralmente se asemeja a NADPH oxidasa, puede ser inhibida por el análogo de arginina N-monometil-L-arginina (L-NMMA). La combinación de NO• con el anión superóxido produce el radical peroxinitrito •ONOO sumamente tóxico, que se escinde al aceptar un protón y forma moléculas reactivas •OH y NO_2. El NO• puede formar complejos mononucleares ditioldinitroso de hierro, lo cual da como consecuencia el agotamiento de los depósitos de hierro y la inhibición de varias enzimas.
c) Fundamentos de los sistemas antimicrobianos independientes del oxígeno.

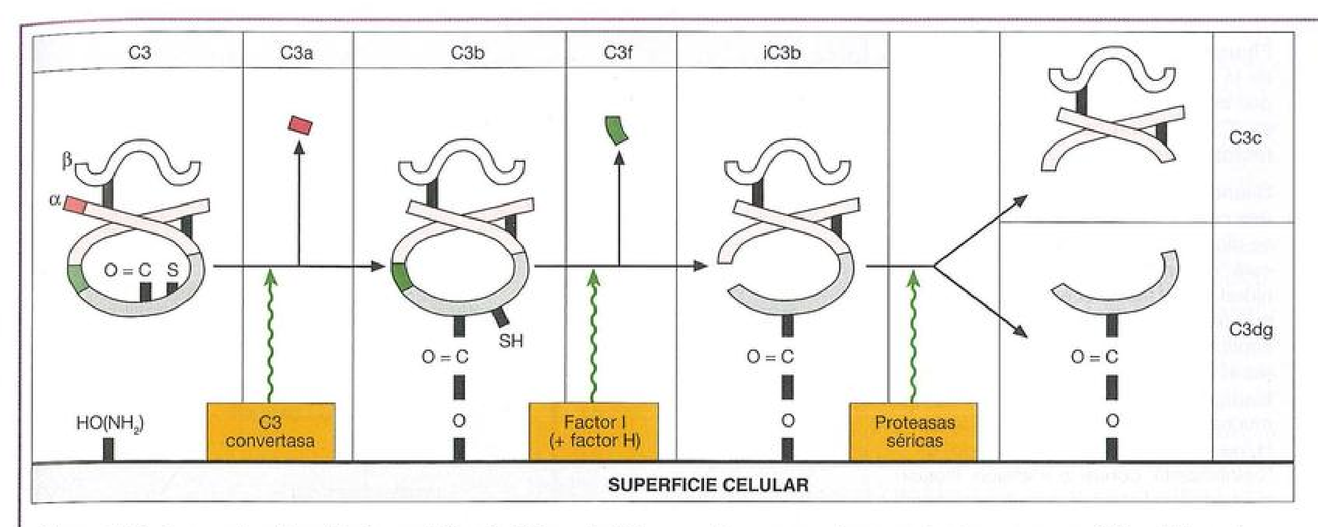


Figura 1.17. Base estructural de la escisión de C3 por la C3 convertasa y su enlace covalente con grupos •OH o •NH_2 en la superficie celular por exposición de los enlaces tioléster internos.

La escisión posterior da lugar a fragmentos cada vez más pequeños, C3dg y C3d, adheridos a la membrana. (Basado en lo esencial en Law S.H.A. and Reid K.B.M. (1988) *Complement*, Figura 2-4. IRL Press, Oxford).

complemento puede parecer en un principio intimidante, pero tenga en mente los objetivos globales de aumentar la fagocitosis, reclutar otras células inmunitarias y producir la lisis directa de los microorganismos.

El complemento y su activación

La cascada del complemento, junto con la coagulación sanguínea, la fibrinólisis y la formación de cininas, constituye uno de los sistemas de enzimas activadoras encontradas en el plasma. Estos sistemas se caracterizan por producir una respuesta rápida y muy amplificada frente a un estímulo desencadenante mediado por un fenómeno en cascada, en el cual el producto de una reacción es el catalizador enzimático de la reacción que sigue.

Algunos de los componentes del complemento se designan con la letra "C" seguida por un número relacionado más con la cronología de su descubrimiento que con su posición en la secuencia de reacción. El componente más abundante y esencial es C3, con peso molecular de 195 kDa y una concentración plasmática de alrededor de 1,2 mg/mL.

C3 sufre escisión espontánea lenta

En condiciones normales, un enlace tioléster interno en C3 (Figura 1.17) se activa espontáneamente a muy baja velocidad, sea por reacción con agua o con vestigios de una enzima proteolítica plasmática, para formar un compuesto intermediario reactivo: el producto de escisión C3b o una molécula de función similar denominada C3i o C3(H_2O). En presencia de Mg^{2+} se pueden formar complejos con otro componente del complemento, el factor B, que luego es escindido por una enzima normal del plasma (factor D) para generar $\overline{C3bBb}$. Cabe destacar que por convención se ha establecido que una barra sobre un complejo denota actividad enzimática y que en la escisión de un componente del complemento por lo general se denomina con el sufijo "b" al producto de mayor tamaño y con "a" al más pequeño.

La $\overline{C3bBb}$ tiene una importante actividad enzimática nueva: es una **C3 convertasa,** capaz de dividir C3 en C3a y C3b. Se analizarán brevemente las importantes consecuencias biológicas de la escisión de C3 relacionadas con las defensas microbianas, pero en condiciones normales debe haber algún mecanismo que restrinja este proceso hasta un nivel "crítico" ya que también puede dar origen a más $\overline{C3bBb}$, es decir, se trata de un **circuito de retroalimentación positiva** con posibilidades de descontrol (Figura 1.18). Como sucede con todas las cascadas potencialmente explosivas, hay poderosos mecanismos reguladores.

La concentración de C3b suele estar rigurosamente controlada

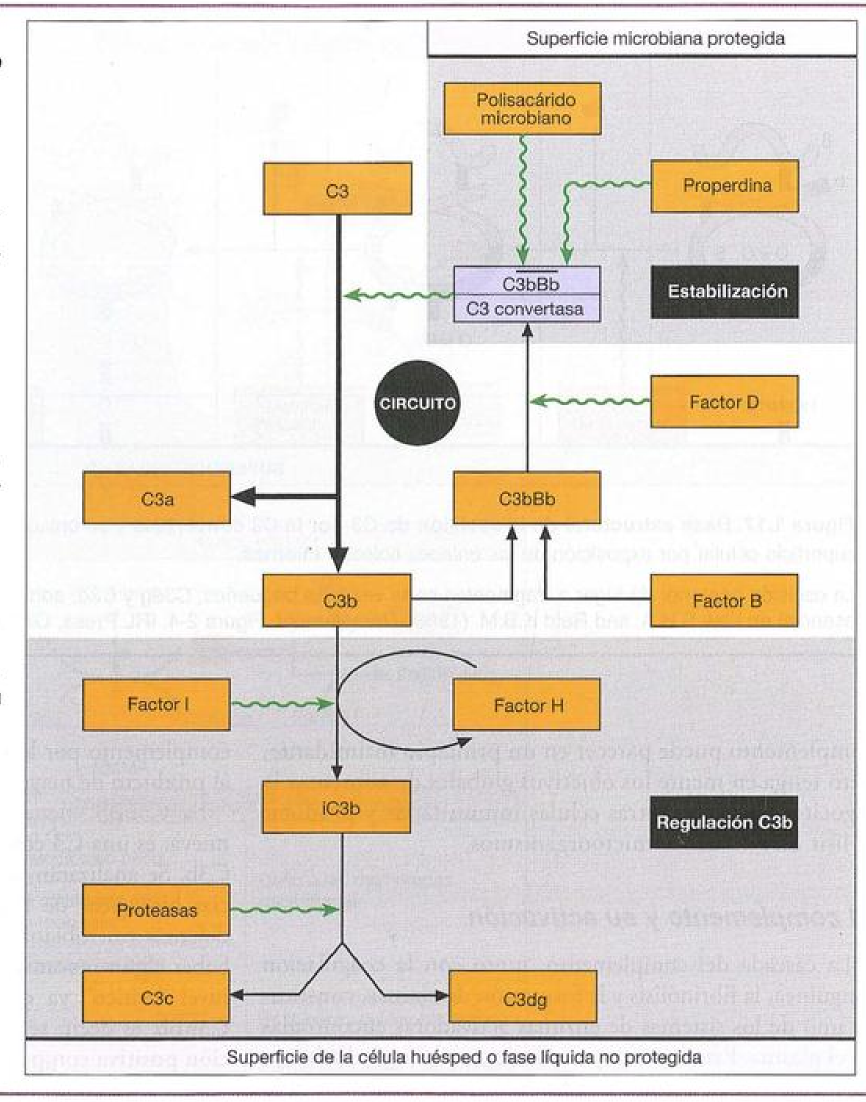
En solución, la $\overline{C3bBb}$ convertasa es inestable y el factor B es desplazado con facilidad por otro componente, el factor H, para formar C3bH susceptible de ser atacado por el inactivador de C3b, factor I (Figura 1.18). El iC3b inactivado carece de actividad biológica y sufre la degradación ulterior por acción de las proteasas de los líquidos corporales. Más adelante se analizarán otros mecanismos reguladores.

La C3 convertasa es estabilizada en las superficies microbianas

Varios microorganismos pueden activar la $\overline{C3bBb}$ convertasa para generar gran cantidad de productos de escisión de C3 **mediante la estabilización de la enzima en sus superficies (hidrocarbonadas),** por lo cual el C3b es protegido del factor H. Otra proteína, la properdina, actúa entonces sobre esa convertasa fijada para estabilizarla más aún. Cuando C3 es escindida por la enzima unida a la membrana de superficie para formar C3b naciente, sufre un cambio de confor-

Figura 1.18. Activación microbiana de la vía alternativa del complemento por estabilización de la C3 convertasa ($C3b\overline{Bb}$) y su control por los factores H e I.

Cuando está unido a la superficie de una célula huésped o en la fase líquida, se dice que el C3b en la convertasa está "desprotegido" debido a que su afinidad por el factor H es mucho mayor que por el factor B, por lo cual es susceptible a la degradación por los factores H e I. Sobre una superficie microbiana, C3b se une al factor B con mucha mayor intensidad que al factor H, de manera que está "protegido" o "estabilizado" contra la escisión, incluso más cuando luego se une a la properdina. Si bien en términos filogenéticos ésta es la vía más antigua del complemento, se descubrió después de otra vía, que se analizará en el próximo capítulo, por lo cual recibió la denominación "alternativa". ⁓→ representa un proceso de activación. La barra horizontal sobre un componente designa su activación.



mación y queda expuesto el enlace tioléster interno potencialmente reactivo. Dado que la semivida de C3b naciente es inferior a 100 microsegundos, sólo puede difundirse a través de una distancia corta antes de formar enlaces covalentes con grupos oxhidrilo o amino disponibles sobre la superficie celular microbiana (Figura 1.17). De este modo, cada sitio catalítico produce acumulación de gran cantidad de moléculas de C3b sobre el microorganismo. Este conjunto de reacciones dirigidas a la degradación de C3, provocada directamente por los microorganismos, se ha denominado **vía alternativa** de activación del complemento (Figura 1.18).

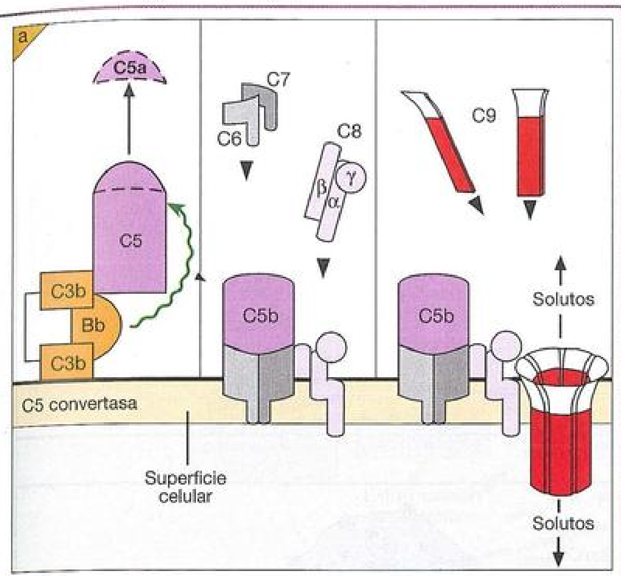
La vía posterior a C3 genera un complejo de ataque de membrana

El reclutamiento de otra molécula de C3b por el complejo enzimático $C3b\overline{Bb}$ genera una C5 convertasa, que activa a C5 por escisión proteolítica, libera un polipéptido pequeño, C5a, y queda el fragmento C5b de mayor tamaño unido en forma laxa con C3b. La adherencia secuencial de C6 y C7 a C5b da lugar a un complejo con un sitio de unión de membrana transitorio y afinidad por la cadena del péptido β de C8. La cadena C8α se sitúa sobre la membrana y dirige los cambios de conformación en C9, que lo transforman en una molécula anfipática capaz de insertarse en la bicapa lipídica y de polimerizarse para constituir un **complejo de ataque de membrana** anular (MAC; Figuras 1.19 y 2.4). Se forma así un canal transmembrana totalmente permeable a los electrólitos y el agua en el que, y debido a la elevada presión osmótica coloidal interna, hay un flujo neto hacia el interior de Na^+ y agua que a menudo conduce a la lisis.

El complemento tiene una diversidad de funciones biológicas defensivas

Estas funciones se pueden agrupar de un modo conveniente bajo tres títulos:

1. **C3b se adhiere a los receptores para el complemento**
   Las células fagocíticas tienen receptores para C3b (CR1) e iC3b (CR3), que facilitan la adherencia de los microorganismos recubiertos por C3b a la superficie celular (descrito con mayor detalle en la p. 323).



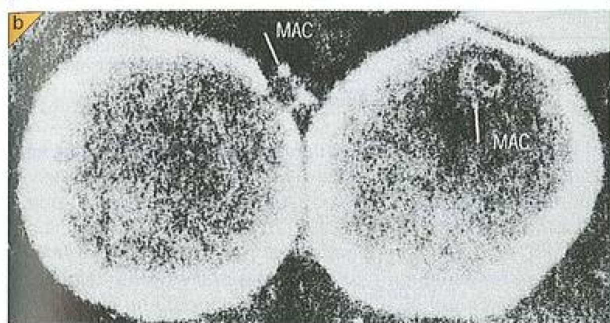


Figura 1.19. Vía posterior a C3 que genera C5a y el complejo de ataque de membrana C5b-9 (MAC).

a) Esquema de ensamble molecular. El cambio de conformación de la estructura de la proteína C9, que la convierte de una molécula hidrófila en otra anfipática (portadora de regiones hidrófobas e hidrófilas), puede ser interrumpido por un anticuerpo generado contra péptidos lineales derivados de C9; como el anticuerpo no reacciona con las formas solubles o unidas a membrana de la molécula, debe detectar una estructura intermedia revelada transitoriamente en un reordenamiento estructural muy profundo. b) Micrografía electrónica de un complejo de membrana C5b-9 incorporado a membranas liposómicas que muestran con claridad la estructura anular. El complejo cilíndrico se observa desde el lado insertado en la membrana del liposoma de la izquierda, y desde el extremo en el de la derecha. Si bien es una estructura espléndida, es posible que la formación del cilindro anular C9 no sea esencial para la alteración citotóxica de la membrana de la célula diana debido a que eso se puede lograr mediante la inserción de moléculas C9 anfipáticas demasiado escasas para formar un MAC claramente definido. (Cortesía del profesor J. Tranum-Jensen y el doctor S. Bhakdi).

2. **Se liberan fragmentos biológicamente activos**
   C3a y C5a, los pequeños péptidos escindidos de las moléculas originales durante la activación del complemento, tienen varias funciones importantes. Ambos actúan directamente sobre los fagocitos, en especial los neutrófilos, para estimular el estallido respiratorio asociado con la producción de especies reactivas del oxígeno y aumentar la expresión de los receptores de superficie para C3b e iC3b. Además, ambos son **anafilotoxinas** por su capacidad de desencadenar la liberación de mediadores de los mastocitos (Figuras 1.10k y 1.20) y su contrapartida circulante, el basófilo (Figura 1.10i), un fenómeno de tal relevancia para esta descripción que en la Figura 1.21 se presentan detalles de los mediadores y sus acciones; obsérvense en particular las propiedades quimiotácticas de estos mediadores y sus efectos sobre los vasos sanguíneos. El C3a ejerce por sí mismo acción quimiotáctica sobre los eosinófilos, mientras que C5a es un poderoso agente quimiotáctico de los neutrófilos y también tiene una notable capacidad para actuar directamente sobre el endotelio capilar con producción de vasodilatación y aumento de la permeabilidad, efectos que parecen ser prolongados por el leucotrieno B4 liberado por los mastocitos, los neutrófilos y los macrófagos activados.
3. **El complejo terminal puede inducir lesiones de membrana**
   Como ya se describió, la inserción del complejo de ataque de membrana en una membrana puede producir lisis celular. Afortunadamente, el complemento es bastante poco eficaz en la lisis de las membranas celulares autólogas del huésped debido a la presencia de proteínas de control.

Ahora es posible organizar un escenario defensivo orquestado con eficacia, iniciado por la activación de la vía alternativa del complemento.

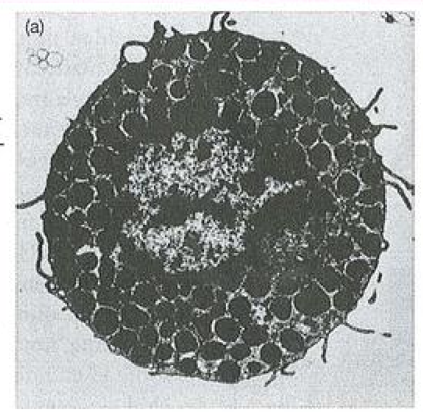
En el primer acto, el complejo $\overline{C3bBb}$ es estabilizado sobre la superficie del microorganismo y escinde grandes cantidades de C3. Se libera el fragmento C3a, pero las moléculas C3b se fijan en abundancia sobre el microorganismo y activan el próximo paso de la secuencia para generar C5a y el complejo de ataque de membrana (si bien muchos microorganismos resisten su acción).

La respuesta inflamatoria

Inflamación es el término dado a la serie de acontecimientos que rodean una respuesta inmunitaria, y muestra varias características típicas como: edema local, eritema (debido a la dilatación capilar), calor y dolor. Estas características son la consecuencia conjunta de la liberación de citocinas, quimiocinas, fragmentos del complemento y aminas vasoactivas por los macrófagos y los mastocitos ante el encuentro inicial con un patógeno. Todos estos mediadores inflamatorios ayudan a reclutar neutrófilos, así como proteínas plasmáticas en el sitio de infección al inducir vasodilatación de los vasos sanguíneos cercanos al sitio de infección y actuar como factores quimiotácticos de los neutrófilos que circulan en la sangre. Las células y el líquido extra que se reúnen en el sitio de una infección (que contribuyen a la inflamación), el aumento del eritema del tono cutáneo y el dolor asociado constituyen la reacción inflamatoria clásica.

Los mastocitos y los macrófagos inician la inflamación

Como mencionamos, el macrófago desempeña un papel fundamental en la iniciación de una respuesta inflamatoria



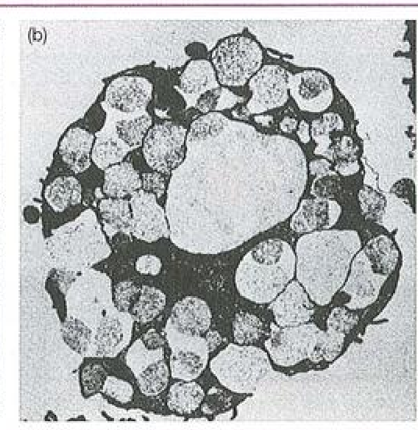
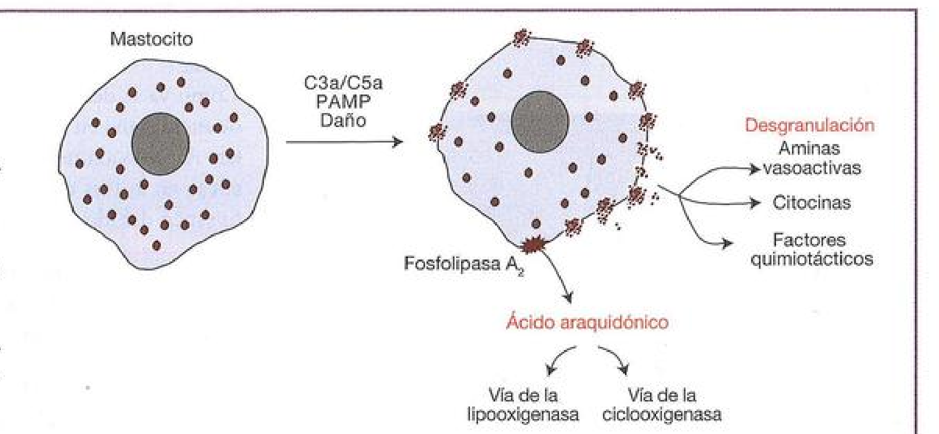
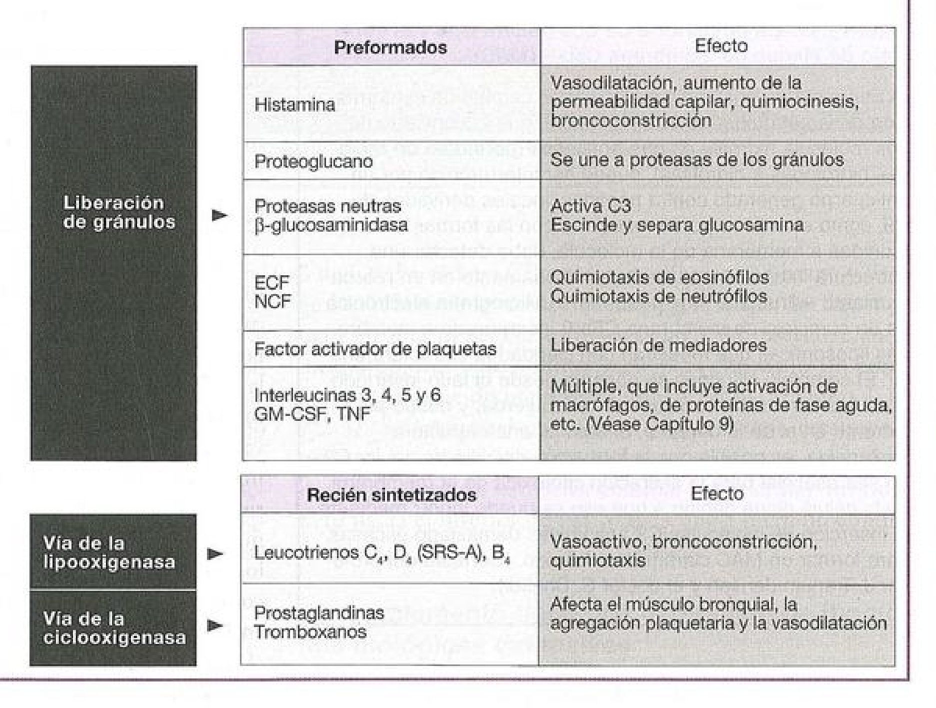


Figura 1.20. Mastocito o célula cebada.

a) Célula en reposo con muchos gránulos unidos a la membrana que contienen mediadores preformados. b) Mastocito activado. Los gránulos han liberado su contenido, y su morfología está alterada, por lo cual son más grandes y menos electrondensos. Si bien la mayor parte de los gránulos alterados se mantiene dentro de la circunferencia de la célula, se abren al espacio extracelular. (Micrografías electrónicas ×5.400.) (Cortesía de los doctores D. Lawson, C. Fewtrell, B. Gomperts y M.C. Raff, *Journal of Experimental Medicine* 1975; **142**, 391).





	Preformados	Efecto
Liberación de gránulos	Histamina	Vasodilatación, aumento de la permeabilidad capilar, quimiocinesis, broncoconstricción
	Proteoglucano	Se une a proteasas de los gránulos
	Proteasas neutras β-glucosaminidasa	Activa C3 Escinde y separa glucosamina
	ECF NCF	Quimiotaxis de eosinófilos Quimiotaxis de neutrófilos
	Factor activador de plaquetas	Liberación de mediadores
	Interleucinas 3, 4, 5 y 6 GM-CSF, TNF	Múltiple, que incluye activación de macrófagos, de proteínas de fase aguda, etc. (Véase Capítulo 9)

	Recién sintetizados	Efecto
Vía de la lipooxigenasa	Leucotrienos C_4, D_4 (SRS-A), B_4	Vasoactivo, broncoconstricción, quimiotaxis
Vía de la ciclooxigenasa	Prostaglandinas Tromboxanos	Afecta el músculo bronquial, la agregación plaquetaria y la vasodilatación

Figura 1.21. La estimulación de mastocitos causa la liberación de mediadores por dos vías principales.

a) Liberación de mediadores preformados que se encuentran en los gránulos; b) metabolismo del ácido araquidónico producido por activación de una fosfolipasa. El Ca^{2+} y el AMP cíclico intracelulares son esenciales para la iniciación de estos procesos, pero aún se desconocen los detalles. La activación de los mastocitos puede producirse a través de C3a, C5a e incluso de algunos microorganismos capaces de actuar directamente sobre los receptores de la superficie celular. En la página 395 se describe la heterogeneidad de los mastocitos. ECF, factor quimiotáctico de eosinófilos; GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; NCF, factor quimiotáctico de neutrófilos. La quimiotaxis designa la migración dirigida de los granulocitos en favor del gradiente de concentración del mediador del mecanismo.

mediante la secreción de citocinas y quimiocinas en respuesta a la ocupación de sus PRR y a través del encuentro con microorganismos opsonizados con C3b (Figura 1. 22). Sin embargo otra célula inmunitaria innata, el **mastocito**, es fundamental para provocar el aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos debido a la liberación de los contenidos de los numerosos gránulos citoplasmáticos que poseen estas células (Figura 1.21). Los gránulos de los mastocitos contienen, entre otros factores, grandes cantidades de la amina vasoactiva histamina (Figura 1.21). La desgranulación de los mastocitos puede ser provocada por lesión directa, en respuesta a los componentes del complemento C3a y C5a, el

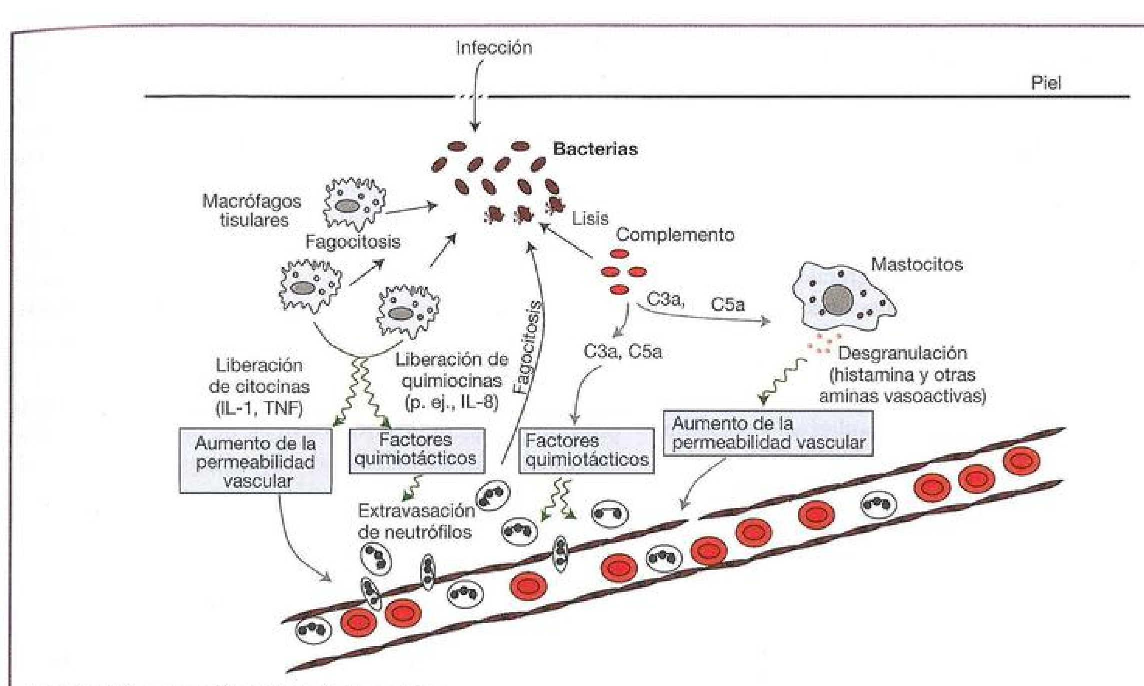


Figura 1.22. Reacción inflamatoria aguda.

La infección bacteriana inicia una serie de respuestas a través de la activación de la vía alternativa del complemento que produce C3a y C5a, así como a través de la estimulación de macrófagos residentes en los tejidos, que detectan PAMP derivados de las bacterias. El componente C3b del complemento se une a la bacteria, que causa su opsonización para una fagocitosis más efectiva por los macrófagos y los neutrófilos. La activación del complemento también puede conducir a la lisis directa de las bacterias a través del ensamblado de los complejos de ataque a la membrana. La activación de los macrófagos por los PAMP y los componentes del complemento induce la secreción de mediadores (citocinas y quimiocinas) de la respuesta inflamatoria aguda que aumentan la permeabilidad vascular. Esto induce a los neutrófilos a que migren desde la sangre hacia el interior del tejido. C3a y C5a inducen la activación de los mastocitos y la secreción de mediadores que provocan dilatación capilar y exudación de las proteínas plasmáticas. Atraídos por C3a y C5a, así como por otros factores, los neutrófilos sanguíneos se pegan a las moléculas de adhesión de la célula endotelial y utilizan esto para proporcionar tracción a medida que fuerzan su pasaje entre las células a través de la membrana basal (con la ayuda de la elastasa secretada) y en favor del gradiente quimiotáctico.

encuentro con PAMP y mediante el enlace del antígeno específico con una clase de anticuerpos (IgE) que se une con avidez a los mastocitos a través de receptores de superficies (las clases de anticuerpos se analizarán en detalle en el Capítulo 3). La histamina provoca dilatación de las vénulas poscapilares, activa el endotelio local y aumenta la permeabilidad de los vasos sanguíneos. La irritación de las terminaciones nerviosas es otra consecuencia de la liberación de histamina y es responsable del dolor asociado a menudo con la inflamación, una adaptación evolutiva que con probabilidad alienta al huésped a proteger el área infectada o lesionada para minimizar el daño.

La relajación inducida en las paredes arteriolares incrementa el flujo sanguíneo y la dilatación de los vasos de pequeño calibre, mientras que la contracción de las células endoteliales capilares permite la exudación de proteínas plasmáticas. Bajo la influencia de las quimiotaxinas, los neutrófilos se desplazan con mayor lentitud, y al estimularse la expresión de las moléculas de adhesión de superficie se marginan sobre las paredes de los capilares, a las que atraviesan por brechas entre las células endoteliales (diapédesis) a favor del gradiente de concentración de factores quimiotácticos, hasta que se enfrentan con el microorganismo recubierto por C3b. Entonces tiene lugar la adherencia a los receptores C3b de los neutrófilos; C3a y C5a, en concentraciones bastante elevadas en el gradiente quimiotáctico, activan el estallido respiratorio y puede comenzar la destrucción del último acto.

Los mecanismos humorales proporcionan una segunda estrategia defensiva

Factores microbicidas en las secreciones

Al volver a los sistemas de defensa mediados en su totalidad por **moléculas de reconocimiento de patrón solubles** (Figura 1.2), cabe recordar que muchos microorganismos activan el sistema del complemento y pueden experimentar lisis por la inserción del complejo de ataque de membrana. La diseminación de la infección puede ser limitada por enzimas que se liberan tras el daño tisular que activa el sistema de la coagulación. De las sustancias bactericidas solubles elaboradas por el cuerpo, quizá la más abundante y difundida sea la enzima lisozima, una muraminidasa que escinde los peptidoglucanos expuestos de la pared de las bacterias susceptibles (véase Figura 12.5).

Al igual que las α-defensinas de los gránulos de los neutrófilos, las β-defensinas humanas son péptidos derivados de precursores de mayor tamaño por escisión proteolítica; tienen estructuras en hoja β, 29-40 aminoácidos y tres enlaces disulfuro intramoleculares, aunque difieren de las α-defensinas en la localización de las seis cisteínas. La principal β-defensina humana, hDB-1, es producida en abundancia en el riñón, el aparato reproductor femenino, la mucosa bucal y sobre todo en las vías aéreas respiratorias. Como se sostiene que todos los días el cuerpo es infectado por cientos de miles de bacterias transportadas por el aire, debe ser un mecanismo de defensa importante. De tal modo, la inhibición de hDB-1 y de una segunda defensina pulmonar, hDB-2, por la elevada fuerza iónica, podría ser la determinante de la susceptibilidad a infecciones de los pacientes con fibrosis quística debido a que presentan una mutación del canal iónico que aumenta la concentración de cloruros en los líquidos de la superficie de las vías aéreas. Otro agente antimicrobiano de las vías aéreas con actividad contra bacterias gramnegativas y grampositivas es la IL-37, un péptido alfahelicoidal de 37 residuos liberado por proteólisis del precursor de una catelicidina (inhibidor de catepsina L).

Esta característica aparece también en el estómago, donde un péptido escindido proveniente de la lactoferrina por acción de la pepsina podría aportar cierta actividad antimicrobiana a las secreciones gástrica e intestinal. En muchas secreciones humanas aparece un péptido bastante más largo de dos dominios con 107 residuos, denominado inhibidor de leucoproteasa secretora (*secretory leukoprotease inhibitor*, SLPI). El dominio C-terminal es antiproteasa, pero el dominio N-terminal constituye un problema desagradable para células fúngicas con actividad metabólica y diversos microorganismos asociados a la piel, por lo cual su producción por los queratinocitos humanos los torna especialmente adecuados. Vale destacar que muchos análogos de péptidos antibióticos con D-aminoácidos forman hélices con giro hacia la izquierda que retienen la capacidad de inducir la creación de canales iónicos de membrana y, en consecuencia, sus poderes antimicrobianos; debido a su resistencia al catabolismo en el cuerpo podrían ser interesantes candidatos para una nueva generación de antibióticos sintéticos. Por último, se pueden mencionar las dos proteínas surfactantes pulmonares SP-A y SP-D, que junto con diversos lípidos disminuyen la tensión superficial de las células de revestimiento epitelial del pulmón para mantener permeables las vías aéreas; pertenecen a un grupo estructural de moléculas totalmente diferentes, denominadas colectinas (véase más adelante), y contribuyen a la inmunidad innata mediante la fijación de sus dominios similares a lectinas a los hidratos de carbono del microorganismo y su eje de colágeno a receptores relacionados sobre las células fagocíticas, por lo cual facilitan la ingestión y la destrucción de los agentes infecciosos.

Cuadro 1.1. Proteínas de fase aguda.

Reactante de fase aguda	Función
Aumento notable de la concentración:	
Proteína C reactiva	Fija complemento, opsoniza
Lectina de unión a manosa	Fija complemento, opsoniza
Glucoproteína ácida α_1	Proteína de transporte
Componente P del amiloide sérico	Precursor del componente amiloide
Aumentos moderados de la concentración:	
Inhibidores de proteinasa α_1	Inhibe proteasas bacterianas
Antiquimotripsina α_1	Inhibe proteasas bacterianas
C3, C9, factor B	Aumenta la función del complemento
Ceruloplasmina	Depurador de $\cdot O_2^-$
Fibrinógeno	Coagulación
Angiotensina	Tensión arterial
Haptoglobina	Se une a hemoglobina
Fibronectina	Adherencia celular

Las proteínas de fase aguda aumentan en respuesta a la infección

Ciertas proteínas plasmáticas, denominadas en conjunto proteínas de fase aguda, muestran un aumento notable de concentración en respuesta a mediadores tempranos "de alarma", como la interleucina 1 (IL-1) derivada de macrófagos y liberada como consecuencia de infección o daño tisular. Son la proteína C reactiva (CRP), la lectina de unión a manosa (MBL) y el componente P del amiloide sérico (Cuadro 1.1). Los niveles de expresión de estas últimas proteínas pueden aumentar hasta 1.000 veces en respuesta a las citocinas proinflamatorias, como IL-1 e IL-6. Entre otras proteínas de fase aguda que experimentan un aumento moderado de la concentración se hallan α_1-antiquimiotripsina, fibrinógeno, ceruloplasmina, C9 y factor B.

Las proteínas de fase aguda son un grupo relativamente diverso de proteínas pertenecientes a varias familias diferentes (incluyen, pero no están limitadas a las familias de la **pentraxina**, la **colectina** y la **ficolina**) que tienen en común una serie de efectos funcionales. Todas estas proteínas actúan como moléculas de reconocimiento de patrón solubles y son capaces de unirse directamente a los agentes infecciosos para actuar como opsoninas (es decir, "listos para la mesa"), lo que aumenta su captación por los macrófagos y los neutrófilos. Muchas de estas proteínas también tienen la capacidad de activar el complemento y el ensamble de un complejo de ataque de membrana. La capacidad de aglutinar microorganismos y, por consiguiente impedir su propagación en el tejido infectado, es otro aspecto común. Algunas de estas moléculas también pueden formar heterocomplejos que amplían la gama de PAMP que pueden detectar.

Estas moléculas de reconocimiento de patrón solubles con frecuencia son sintetizadas por macrófagos activados tras la estimulación de sus receptores de reconocimiento de patrones, o están almacenadas en los gránulos de neutrófilos disponibles para la liberación inmediata a través de la desgranulación en respuesta a la infección. El hígado es otra fuente importante de muchas proteínas de fase aguda que se liberan a la circulación como consecuencia de los efectos sistémicos de las principales citocinas proinflamatorias IL-1 e IL-6. Veamos algunos ejemplos más.

Pentraxinas

Las pentraxinas (denominadas así porque están formadas por cinco subunidades idénticas) constituyen una superfamilia de proteínas conservadas caracterizadas por una estructura multimérica cíclica y un dominio pentraxina C-terminal de 200 aminoácidos. La CRP, el componente P del amiloide sérico (SAP) y la pentraxina son tres miembros de esta familia de componentes. La CRP humana está compuesta por cinco unidades polipeptídicas idénticas unidas de modo no covalente y dispuestas como un pentámero cíclico alrededor de una cavidad fijadora de calcio (Ca); fue la primera pentraxina descrita y es el prototipo de proteína de respuesta de fase aguda. Estas pentraxinas proteicas han sido halladas en el reino animal desde hace bastante tiempo debido a que un homólogo muy relacionado, la limulina, aparece en la hemolinfa del cangrejo herradura, no precisamente un pariente cercano del *Homo sapiens*. Una de las principales propiedades de la CRP es su capacidad de unirse de una manera dependiente de calcio, como molécula de reconocimiento de patrón, a numerosos microorganismos que contienen fosforilcolina en sus membranas; el complejo tiene la útil propiedad de activar el complemento (por la vía clásica y no por la vía alternativa que conocemos hasta ahora). Esto causa el depósito de C3b sobre la superficie del microorganismo, que queda opsonizado para su adherencia a los fagocitos.

El SAP puede formar un complejo con el condroitinsulfato, un glucosaminoglucano de la matriz celular, y luego unirse a enzimas lisosómicas, como la catepsina B liberada dentro de un foco de inflamación. El SAP degradado se convierte en un componente de los depósitos amiloides fibrilares que acompañan a las infecciones crónicas, e incluso puede ser un iniciador fundamental para el depósito de amiloide. El SAP también se une a varias especies bacterianas a través del LPS y, a semejanza de la CRP, también puede activar la vía clásica del complemento. CRP y SAP representan los principales reactantes de fase aguda en el ser humano y el ratón, respectivamente.

Colectinas

Hasta ahora se describieron nueve miembros de la familia colectina en los vertebrados, de los cuales el más estudiado es la **lectina de unión a manosa** (**MBL**, ***mannose-binding lectin***). La MBL puede reaccionar no sólo con manosa, sino también con otros azúcares, lo cual le permite unirse con una variedad excepcionalmente amplia de bacterias gramnegativas y grampositivas, levaduras, virus y parásitos. Su capacidad posterior para activar la C3 convertasa clásica, por medio de dos serinproteasas nuevas asociadas (MASP-1 y MASP-2), es la base de lo conocido como **vía de la lectina** de la activación del complemento. (Por favor, tómenlo con calma, en el próximo capítulo se desentrañarán los secretos de las vías clásica y de la lectina.)

La MBL es un múltiplo de complejos triméricos y cada unidad contiene una región similar de colágeno ligada a un dominio globular de unión a la lectina. Esta estructura la sitúa en la familia de las colectinas (**colágeno** + **lectina**), las cuales tienen la capacidad de reconocer patrones de hidratos de carbono "extraños" que difieren de los polisacáridos de superficie "propios", por lo general con grupos terminales de galactosa y ácido siálico, mientras que la región de colágeno se puede unir a las células fagocíticas y activarlas a través de receptores complementarios sobre su superficie. Las colectinas, en especial MBL y las moléculas surfactantes alveolares SP-A y SP-D ya mencionadas, poseen muchos atributos que las califican para funciones de primera línea en la inmunidad innata, entre ellas la capacidad de diferenciar lo propio de lo no propio, unirse a diversos microorganismos, generar mecanismos efectores secundarios y aparecer muy distribuidas en todo el cuerpo, incluso en las secreciones mucosas. En realidad, son la contrapartida soluble de los PRR de lectina tipo C de la superficie celular descritos antes.

El interés por la colectina conglutinina aumentó en época reciente con la demostración, en primer lugar, que se encuentra en seres humanos y no sólo en bovinos y, en segundo lugar, que se puede unir a N-acetilglucosamina. Como es polivalente, esto implica la capacidad de recubrir las bacterias con C3b mediante cruzamientos entre el residuo de azúcar disponible en el fragmento del complemento y el proteoglucano bacteriano. Si bien no se sabe con certeza si la conglutinina es miembro de la familia de proteínas de fase aguda, se la menciona aquí porque refuerza el concepto general de que la evolución de las moléculas similares a la lectina, que se unen a los polisacáridos microbianos en lugar de hacerlo a los propios y que luego se vinculan por sí mismos al sistema del complemento o a las células fagocíticas, es una forma útil y probada de protección para el huésped.

Ficolinas



Estas proteínas están relacionadas estructural y funcionalmente con las colectinas y también pueden reconocer los PAMP sobre la base de los hidratos de carbono de los microorganismos para activar la vía de la lectina de la activación del complemento. De modo característico, las ficolinas reconocen residuos de *N*-acetilglucosamina en los hidratos de carbono complejos, además de otros ligandos. Se han identificado tres ficolinas en los seres humanos, ficolina-1, ficolina-2 y ficolina-3 (también conocidas como ficolinas M, L y H, respectivamente), y también se demostró que estas proteínas actúan como opsoninas para reforzar la fagocitosis. Las ficolinas también pueden interactuar con la CRP para ampliar la gama de bacterias reconocidas por esta última e incrementar la destrucción mediada por complemento. El espectro de estructuras bacterianas reconocidas por las ficolinas y la MBL es complementario y reconocen especies bacterianas diferentes pero superpuestas.

Los interferones inhiben la replicación viral

Del análisis anterior sobre receptores de reconocimiento de patrón (PRR), recuérdese que la ocupación de muchos de estos receptores por los PAMP da por resultado la producción de citocinas y quimiocinas que actúan para amplificar las respuestas inmunitarias por la unión a células de la vecindad. Una clase importante de citocinas inducidas por la infección viral o bacteriana es la de los **interferones** de tipo 1 (IFNα e IFNβ). Son una familia de agentes antivirales de amplio espectro, presentes en aves, reptiles y peces, además de mamíferos. Fueron descubiertos por el fenómeno de interferencia viral en el que un animal infectado por

un virus resiste la sobreinfección por un segundo virus no relacionado. Se han identificado distintas formas moleculares de interferones y todas han sido clonadas genéticamente. Hay por lo menos 14 interferones alfa (IFNα) producidos por leucocitos, mientras que los fibroblastos, y tal vez todos los tipos celulares, sintetizan IFNβ. Por ahora no se comentará un tercer tipo (IFNγ), no inducido directamente por virus.

Cuando las células son infectadas por un virus sintetizan interferón y lo secretan al líquido extracelular, donde se une a receptores específicos sobre células vecinas no infectadas. Como vimos antes, la interacción de varios miembros de la familia TLR, así como los receptores de helicasa similares a RIG con sus cognados PAMP, da como resultado la inducción de los miembros de la familia de factores de transcripción del factor regulado por interferón (IRF) (Figura 1.7). En combinación con NFκB, otro factor de transcripción activado por la ocupación de varios de los PRR, los IRF inducen la expresión de interferones de tipo I que son secretados y se unen a las células de la vecindad. Las moléculas largas de RNA bicatenario, que se producen durante el ciclo de vida de la mayoría de los virus, son particularmente buenos inductores de interferones. El interferón unido ahora ejerce su efecto antiviral de la siguiente manera. Se considera que en la célula tratada con interferón se desreprimen al menos dos genes, lo cual permite la síntesis de dos enzimas nuevas. La primera, una proteincinasa, llamada **proteincinasa R** (PKR), cataliza la fosforilación de una proteína ribosómica y un factor de iniciación (eIF-2) necesario para la síntesis de proteínas. El efecto neto de esto es reducir drásticamente la traducción de proteínas como medio de reducir la eficiencia de la producción de virus. Otro producto génico inducido por interferones, la **oligoadenilato sintetasa**, cataliza la formación de un polímero corto de ácido adenílico que activa una endorribonucleasa latente; esto a su vez degrada tanto el mRNA viral como el del huésped. Ésta es otra adaptación diestra que está destinada a reducir la creación de productos virales. Otra consecuencia de la disminución en la síntesis de proteínas es la reducción en la expresión de proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), que convierte a las células en susceptibles a los efectos de las células *natural killer* (véase más adelante).

El resultado neto es la formación de un cordón de células no infectables alrededor del sitio de infección viral, de manera que se restringe su diseminación. La eficacia del interferón *in vivo* se puede inferir de experimentos en ratones en los que se inyectó un antisuero contra interferones murinos, tras lo cual se observó que morían con dosis de virus varios cientos de veces inferiores que las necesarias para matar a los controles. Cabe suponer que el interferón desempeña una función importante en la recuperación de infecciones virales, a diferencia de su prevención.

Como grupo, los interferones podrían desempeñar una función biológica más amplia que el control de la infección viral. Por ejemplo, parece obvio que las enzimas inducidas antes descritas podrían actuar como inhibidores de la división de las células del huésped con la misma eficacia que en la replicación viral.

Células *natural killer*

Hasta el momento nos hemos referido a situaciones en las que los agentes infecciosos residen en el espacio extracelular. Pero, qué sucede si un agente infeccioso logra ingresar en las células del huésped, donde están protegidos de los PRR solubles (p. ej., complemento) y también de la fagocitosis por los macrófagos y los neutrófilos. Para hacer frente a esta situación se desarrolló otro tipo de célula inmunitaria, la *célula natural killer* (NK), que está dotada de la capacidad de inspeccionar las células del huésped para detectar signos de patrones anormales de expresión de proteínas que pueden indicar que esas células podrían albergar un virus. Las células NK también pueden destruir las células que han sufrido mutaciones y están en vías de transformación maligna en tumores. Nótese que aunque las células NK constituyen un componente de la respuesta innata, en ciertas circunstancias desarrollan memoria inmunitaria, una característica que por lo general se limita a las respuestas adaptativas.

Las células NK destruyen las células huéspedes que aparecen anormales

Las células NK son leucocitos granulares grandes con una morfología característica. Las células NK eligen sus víctimas sobre la base de dos criterios principales. El primero, denominado **pérdida de lo propio**, relaciona el hecho de que prácticamente todas las células nucleadas del organismo expresan moléculas sobre su.superficie, denominadas proteínas del **complejo mayor de histocompatibilidad**. Estas moléculas cumplen una función muy importante en activar las células del sistema inmunitario adaptativo, que analizaremos después en este capítulo, pero por ahora es suficiente saber que una célula que carece de moléculas del CMH no es una buena propuesta desde la perspectiva del sistema inmunitario. Las células NK existen como una contramedida para una eventualidad de este tipo, y las células que carecen del patrón normal de expresión de moléculas del CMH son reconocidas con rapidez y destruidas por las células NK. Como vimos en la sección anterior dedicada a los interferones, una forma en la que puede reducirse la expresión de moléculas del CMH es consecuencia de los productos génicos que responden al interferón que pueden interferir con la traducción de proteínas dentro de las células infectadas por virus o en las proximidades de estas células.

Además de la expresión reducida o ausente del CMH, las células NK son capaces de inspeccionar las células para la expresión de moléculas relacionadas con el CMH (llamadas moléculas no clásicas del CMH) y otras proteínas que normalmente no se expresan en las células, pero se convierten así en respuesta a ciertas situaciones de estrés, como el daño del DNA. Este escenario representa la **alteración de lo propio** y también determina que estas células queden señaladas para que sean reconocidas por las células NK y culmina con su destrucción rápida. También se halló que los receptores NK son capaces de detectar ciertas proteínas virales directamente, como la hemaglutinina del virus influenza, y que pertenecen a otra clase de PRR. Hay otros receptores en la superficie de las células NK que hacen posible que estas

Figura 1.23. Muerte por linfocitos citotóxicos.

En esta serie tomada a intervalos prefijados se observa una célula NK (flechas rojas) que toma contacto estrecho con una célula diana (flechas verdes), que con rapidez la rodea y da origen a la formación vigorosa de protrusiones de la membrana dentro de la célula diana a medida que sufre apoptosis. El intervalo entre cada recuadro es de 80 minutos. La figura fue gentilmente provista por el Dr. Sean Cullen, Martin laboratory, Trinity College Dublin, Irlanda.

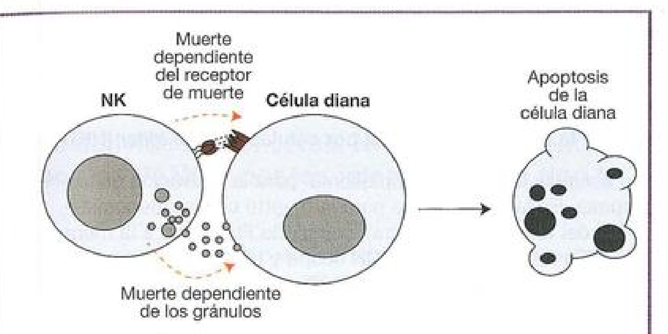


Figura 1.24. Las células *natural killer* (NK) pueden destruir las células diana por dos mecanismos principales: el "receptor de muerte" (receptor de apoptosis) y las vías dependientes de los gránulos.

En ambos casos, la célula diana muere como consecuencia de la activación de una serie de proteasas dentro de la célula diana, conocidas como caspasas. Para mayor detalle de los mecanismos moleculares de muerte en cualquiera de los casos véase la Figura 1.25.

células reconozcan células infectadas o transformadas, pero se analizarán en el Capítulo 4. Resulta claro que una NK no es una célula para tener de enemiga.

Las células NK destruyen las células diana por dos mecanismos diferentes

Tras el reconocimiento de una célula diana, a través de cualquiera de los mecanismos mencionados en la sección anterior, la célula NK cuenta con dos armas principales que, en cualquiera de los casos, es suficiente para matar una célula diana en cuestión de 30-60 minutos (véase Videoclip 3). En ambos casos, la célula diana muere por la puesta en marcha de su propia maquinaria de muerte celular como consecuencia del encuentro con la célula NK; así, la muerte por NK representa un tipo de suicidio celular asistido. Durante la muerte mediada por NK, las células diana y *killer* se encuentran en estrecha aposición (Figura 1.23) como resultado de la detección de la pérdida de lo propio o la alteración de lo propio en la superficie de la célula diana. Esto puede promover el mecanismo del **receptor de muerte** (receptor de apoptosis) o el mecanismo **dependiente de los gránulos** hacia la apoptosis (Figura 1.24). Vamos a considerar ambos procesos por separado, aunque los resultados son muy similares.

Muerte celular dependiente del receptor de muerte

Los receptores de muerte son un subconjunto de la superfamilia de receptores TNF, que incluye los receptores para Fas, TNF y TRAIL, y el nombre de estas moléculas deriva de la observación de que la unión de estos receptores con el ligando apropiado puede llevar a la muerte de la célula que porta el receptor (Figura 1.24). Cuando esto se observó por primera vez, fue una propuesta bastante sorprendente porque sugería que una célula podía ser destruida mediante el simple recurso de afectar un receptor de membrana en la forma correcta. Está claro que es un tipo de destrucción muy diferente a la que se observa tras la exposición de una célula a un estrés físico o químico tóxico que pueden matarla a través de la interrupción de los procesos celulares normales. Aquí hay un sistema fisiológico de receptor/ligando que existe con el propósito de matar las células a demanda, algo que el sistema inmunitario hace mucho. Por supuesto, esto suscitó varias investigaciones dirigidas hacia la comprensión de cómo la unión de Fas, TNF y receptores relacionados culmina en la muerte celular, y esto ahora se comprende con precisión como una consecuencia. La interac-

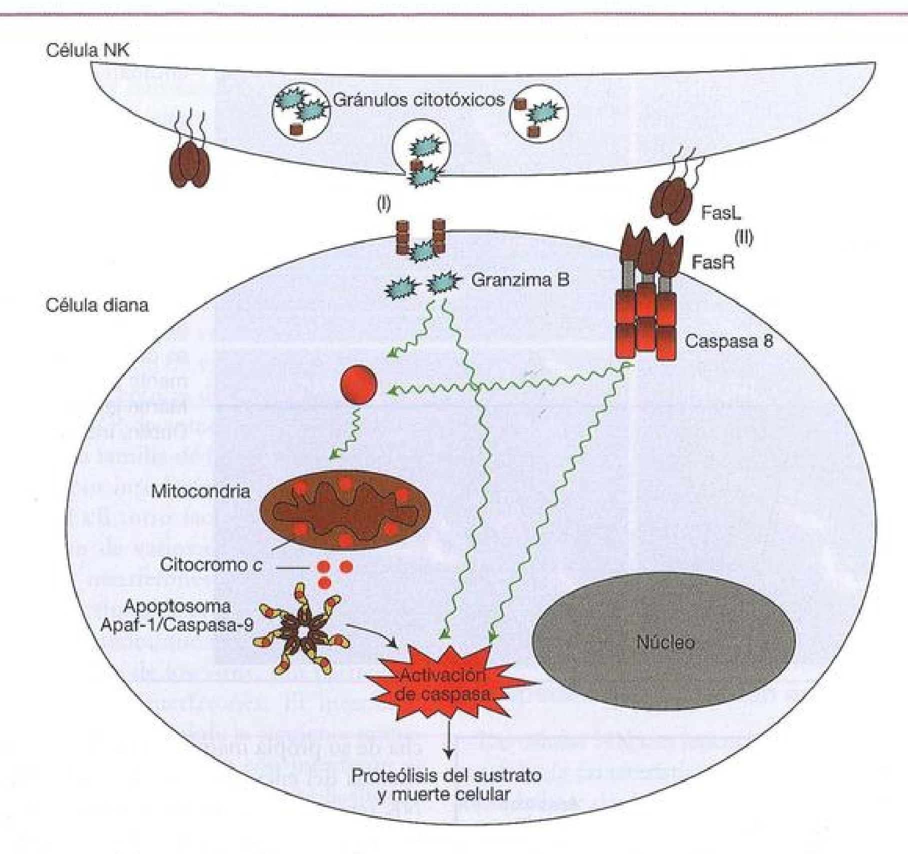


Figura 1.25. Acontecimientos de la transducción de señal implicados en la apoptosis mediada por células *natural killer* (NK).

Las células NK pueden matar las células diana por dos vías principales (I) o (II), como se muestra. En la vía dependiente de gránulos citotóxicos (I), la unión de los receptores NK a la superficie de la célula infectada por un virus activa la liberación extracelular de perforina (una proteína formadora de poros) y granzimas (que son una colección de proteasas diversas) provenientes de los gránulos citotóxicos de la célula NK; la perforina se polimeriza dentro de la membrana de la célula diana para formar canales transmembrana que permiten la entrada de las granzimas al interior de la célula diana. Las granzimas inducen la muerte celular por apoptosis a través de la activación de la cascada de proteasas caspasas, sea en forma directa por el procesamiento y la activación de las caspasas o a través de la liberación de citocromo c a partir de las mitocondrias que estimula la vía del "apoptosoma" para la activación de la caspasa. En la segunda vía para la muerte celular (denominada vía del receptor de muerte), el ligando Fas unido a la membrana (FasL) sobre la célula NK ocupa y trimeriza los receptores Fas de superficie localizados sobre la célula diana. La ocupación de los receptores Fas recluta la proteína adaptadora FADD, seguida por la caspasa-8, que entonces se activa en el receptor. La caspasa-8 puede estimular más aún la activación de la caspasa a través del procesamiento directo de otras caspasas o por la vía del apoptosoma mitocondrial similar a las granzimas. En ambas vías se produce la vía final común a la apoptosis como resultado de la activación de varias "caspasas ejecutoras" que coordinan la muerte celular a través de la proteólisis restringida de cientos de proteínas celulares.

ción de los receptores Fas o TNF con sus ligandos triméricos causa el reclutamiento de una proteasa, llamada **caspasa-8**, en el complejo receptor que se activa como resultado de la agregación inducida por el receptor de esta proteasa que ahora sufre autoactivación (Figura 1.25). A continuación, la activación de la caspasa-8 en el receptor causa la propagación de la cascada de señalización de dos maneras posibles, ya sea por la proteólisis de Bid, que envía la señal a través de las mitocondrias o por el procesamiento directo de otras **caspasas efectoras** (caspasas 3 y 7) en sentido anterógrado. En cada caso, la activación de las caspasas efectoras culmina con la muerte de la célula a través de la apoptosis que, como hemos mencionado antes en este capítulo, representa un modo programado de muerte celular. Las células NK pueden destruir las células diana de un modo dependiente del ligando Fas, pero también lo pueden hacer en cierta medida a través del ligando relacionado al TNF.

Muerte celular dependiente de los gránulos

Las células NK también tienen gránulos citotóxicos que contienen una serie de serinproteasas, llamadas **granzimas**, así como una proteína formadora de poros, denominada **perforina**. La activación de la célula NK conduce a la polarización de los gránulos entre el núcleo y la célula diana en pocos minutos, y a la liberación extracelular de su contenido hacia el espacio entre las dos células, a lo cual sigue la muerte de la célula diana. La polarización de los gránulos hacia la célula diana tiene lugar como resultado de la formación de una sinapsis entre ambas células que está compuesta por una molécula de adhesión denominada LFA-1 y su receptor cognado ICAM-1.

La perforina guarda cierta homología estructural con C9; como esa proteína, pero sin otra ayuda que la del Ca^{2+}, puede insertarse en la membrana de la célula diana, al pare-

cer por la unión a la fosforilcolina a través de su dominio anfipático central. Luego se polimeriza para formar un poro transmembrana con estructura anular comparable a la del complejo de ataque de membrana del complemento (Figura 1.25). Este poro facilita el ingreso de otros componentes citotóxicos de los gránulos, la granzimas, que producen la muerte real. Los animales deficientes de perforina están seriamente comprometidos en términos de su capacidad para destruir células diana debido a que la vía dependiente de los gránulos no funciona más en ausencia de un mecanismo para proveer las granzimas en la célula diana.

Las granzimas causan la muerte a través de la proteólisis de una variedad de proteínas dentro de la célula diana. La mayor parte del potencial letal reside en las granzimas A y B; sigue sin estar clara la acción de varias otras granzimas (H, K y M en los seres humanos). Se comprende con claridad el modo de acción de la **granzima B**; esta proteasa en esencia remeda la acción de la caspasa-8 en el mecanismo del receptor de muerte en la apoptosis, como se describió antes. Así, tras el ingreso en la célula diana, la granzima B puede iniciar la apoptosis por la escisión de Bid o a través del procesamiento directo y la activación anterógrada de las caspasas efectoras (Figura 1.25). Ambas vías dan como resultado la activación de las caspasas efectoras que coordinan la destrucción de la célula a través de la proteólisis restringida de cientos de proteínas celulares fundamentales.

La actividad de la célula NK puede aumentar por los PAMP y por los interferones de tipo I

Ya se mencionó que los macrófagos despliegan una gama amplia de receptores para los PAMP, de los cuales un subgrupo importante son los TLR. De manera similar, estudios recientes también encontraron que las células NK expresan un subconjunto de TLR que están centrados en detectar PAMP, como RNA bicatenario, que se asocian con los virus. TLR3, TLR7 y TLR8 parecen ser funcionales en las células NK y, ante la ocupación de estos receptores, las células NK se activan y aumentan su potencial de destrucción. El interferón α y el interferón β son también activadores importantes de las células NK, cuyos efectos pueden aumentar la actividad destructiva de estas células hasta 100 veces. Esto es un buen ejemplo de cooperación entre células del sistema inmunitario, en el que las citocinas producidas por macrófagos u otras células tras la detección de un patógeno activan otras células, las NK en este contexto, que pueden estar mejor adaptadas para hacer frente a la amenaza infecciosa.

Las células NK activadas pueden amplificar las respuestas inmunitarias a través de la producción de IFNγ

Otra consecuencia de la activación de las células NK es la producción de otro tipo de interferón, IFNγ, una citocina importante que tiene un conjunto de actividades distintas de las del IFNα y el IFNβ. Los macrófagos responden al IFNγ con el incremento de sus actividades microbicidas y también mediante la producción de otras citocinas (como IL-12) que tienen efectos sobre las células del sistema inmunitario adaptativo. Otro efecto del IFNγ es mejorar la función de **presentación del antígeno** de las células dendríticas, que también es importante para la activación del sistema inmunitario adaptativo, un tema a los que nos referiremos enseguida. Esta citocina también puede influir en el tipo de respuesta inmunitaria adaptativa que se monta al ayudar a polarizar las células T hacia un patrón de respuesta determinada; esto se describirá en detalle en el Capítulo 9.

Inmunidad frente a los parásitos de gran tamaño

Dado que los agentes infecciosos son, en su mayoría, de un tamaño mucho menor que el macrófago o el leucocito promedio, la fagocitosis de dichos agentes es una estrategia razonable para su eliminación. Pero, ¿qué sucede en situaciones en las que el organismo invasor empequeñece por completo a las células fagocíticas del sistema inmunitario? En estos casos es importante un "primo" cercano de los leucocitos: el eosinófilo (Figura 1.10c).

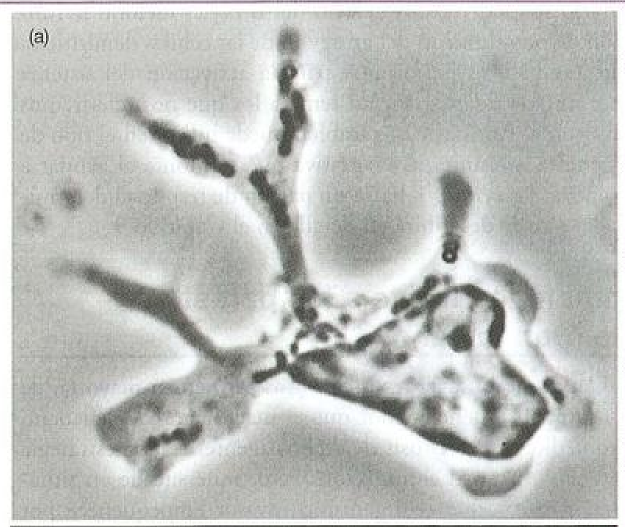
Eosinófilos

Los parásitos de gran tamaño, como los helmintos, no pueden ser físicamente fagocitados y la destrucción extracelular, a cargo de los eosinófilos, parece haber evolucionado para contribuir a la solución de este problema. Esos polimorfonucleares "primos" de los neutrófilos tienen gránulos bien diferenciados, que se tiñen ávidamente con colorantes ácidos (Figura 1.10c) y presentan un aspecto característico en el microscopio electrónico (Figura 12.25). Una proteína básica importante se localiza en el centro del gránulo, mientras que en su matriz se ha identificado una proteína catiónica eosinófila junto con una peroxidasa. También se encuentran otras enzimas, como arilsulfatasa B, fosfolipasa D e histaminasa. Estas células tienen receptores de superficie para C3b y su activación produce un estallido respiratorio muy impresionante, con generación simultánea de metabolitos activos de oxígeno. No satisfecha con esto, la naturaleza también dotó a la célula con proteínas granulares capaces de producir en ella un tapón transmembrana de modo similar a C9 y la perforina de NK. Una célula bastante peligrosa.

La mayoría de los helmintos puede activar la vía alternativa del complemento, pero aunque resistente al ataque de C9, su cubierta con C3b permite la adherencia de eosinófilos a través de sus receptores C3b. Si este contacto conduce a la activación, el eosinófilo inicia su ataque extracelular, que comprende la liberación de las principales proteínas básicas y, en especial, la proteína catiónica que daña la membrana del parásito.

El sistema inmunitario innato estimula la inmunidad adaptativa

Como hemos visto a lo largo de este capítulo, cualquier agente infeccioso que logra ingresar en el organismo enfrenta un abanico formidable de armas defensivas, que van desde la fagocitosis mediada por leucocitos y macrófagos



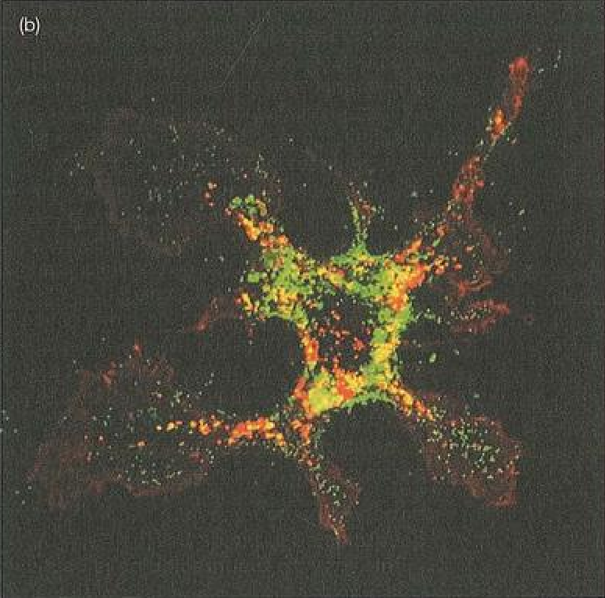


Figura 1.26. Morfología de la célula dendrítica.

a) Imagen con contraste de fase de una célula dendrítica no teñida con las características ramificaciones (*dendron* significa árbol). b) Imagen con microscopia de fluorescencia confocal de una célula dendrítica que ha fagocitado micropartículas fluorescentes verdes, seguido por la tinción de la membrana citoplasmática con aglutinina de germen de trigo conjugada con Alexa 594 (rojo) para marcar la superficie de hidratos de carbono. La imagen a) fue gentilmente proporcionada por el Dr. Ralph Steinman, The Rockefeller University, Nueva York, Estados Unidos, y publicada en "*Mononuclear phagocytes in immunity, infection, and pathology*" ed. R. van Furth, Blackwell Scientific (1975) p. 96. La imagen b) fue gentilmente proporcionada por el Dr. Jim Harris y el Dr. Ed Lavelle, Trinity College Dublin, Irlanda.

hasta el ataque mediado por complemento, la perforación de la membrana por defensinas y la digestión por enzimas extracelulares. Como si todo esto no fuera suficiente, el sistema inmunitario innato también desempeña una función esencial para poner en marcha una respuesta inmunitaria que se adapta de manera singular a la infección en curso. Esto se logra mediante una llamada a las células del sistema inmunitario adaptativo y la instrucción a estas células acerca de la naturaleza de los antígenos particulares que son la causa de preocupación. Esta función, llamada **presentación del antígeno**, se lleva a cabo en gran parte, pero no exclusivamente, por una célula que recién en los últimos tiempos adquirió importancia crítica como un intermediario entre los sistemas inmunitarios innato y adaptativo: la **célula dendrítica.**

Las células dendríticas, descubiertas por Steinman y Cohn en 1973, se producen sobre todo en la médula ósea y su nombre proviene de varias proyecciones largas de membrana o dendritas que poseen (Figura 1.26). Estas células comparten un progenitor común con los macrófagos por lo que ambos tipos celulares, macrófagos y células dendríticas, tienen ciertas funciones superpuestas. Las células dendríticas conceden de modo efectivo permiso para que las **células T** del sistema inmunitario adaptativo se involucren en la lucha contra una infección. Esto lo logran al proporcionarles a estas células **dos señales** que son esenciales para que una **célula T virgen** (*naive*, es decir, una célula que no ha participado previamente en una respuesta inmunitaria) sea activada, y sufra expansión clonal y diferenciación hasta una **célula T efectora** plena (es decir, capaz de montar las respuestas inmunitarias). La función de las células T en la respuesta inmunitaria se analizará con mucho mayor detalle en el Capítulo 9; por ahora es suficiente saber que las células T activadas realizan una gama de funciones que fortalecen los esfuerzos del sistema inmunitario adaptativo mediante la provisión de citocinas para ayudar a activar a los macrófagos y atraer a los neutrófilos. Algunas células T también tienen funciones muy similares a las células NK y pueden detectar y destruir las células infectadas por virus, mientras que otras células T ayudan en la producción de anticuerpos, funciones que analizaremos en el siguiente capítulo.

Las células dendríticas proporcionan un conducto entre los sistemas inmunitarios innato y adaptativo

Similares a los macrófagos, las células dendríticas migran hacia los tejidos donde residen en un estado quiescente y realizan un muestreo continuo de su entorno mediante los procesos de pinocitosis y fagocitosis. A estas células se las denominaron de diferentes modos según el tejido en las que se encuentran; por ejemplo, a las células dendríticas de la piel se las llama células de Langerhans. Las células dendríticas están equipadas con una serie de TLR y otros PRR, y de modo similar a los macrófagos, funcionan como centinelas a la espera de detectar signos de infección o de daño tisular (es decir, la ocupación de algunos de sus PRR). Sin embargo, a diferencia del macrófago, las células dendríticas no inician la lucha inmediata ante la ocupación de los PRR sino más bien migran al ganglio linfático más cercano (que actúa como una especie de cuartel del ejército de los linfocitos) para llevar a cabo una función especial, denominada **presentación del antígeno**, que despierta a las células del sistema inmunitario adaptativo (Figuras 1.27 y 1.28). Esto se analizará con mucho mayor detalle en el Capítulo 5, pero ahora

(a)

Célula dendrítica inmadura

PAMP
IL-1
TNF

Célula dendrítica madura

Inmóvil
CMH bajo
Muy fagocítica
B7 bajo (coestimulador deficiente)

Móvil
CMH elevado
Poco fagocítica
B7 elevado (coestimulador)

(b)

Figura 1.27. La maduración de la célula dendrítica es inducida por los PAMP y otros signos de infección.

a) Las células dendríticas llevan a cabo la maduración y están preparadas para presentar el antígeno, y proporcionan señales coestimuladoras con la activación mediante patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP) (o patrón molecular asociado al peligro [DAMP]), debido a que conducen a un aumento espectacular en la expresión de moléculas de superficie del CMH y B7 sobre la célula dendrítica. La expresión de proteínas de la familia B7 es controlada por NFκB, que es activado en sentido anterógrado de muchos PRR. Mientras que las células dendríticas inmaduras son relativamente inmóviles, las células dendríticas maduras son muy móviles y migran hacia los tejidos linfoides secundarios para presentar el antígeno a las células T. b) Las células de Langerhans de la epidermis de ratón (es decir, las células dendríticas de la piel) se tiñeron para langerina (verde) y moléculas de clase II del CMH (rojo), ya sea antes (izquierda) o después de la maduración (derecha). Nótese que antes de la maduración de la célula dendrítica, las moléculas de clase II del CMH (rojo) están presentes en forma intracelular, mientras que después de la maduración se detectan con facilidad en la superficie celular. Las fotografías de la parte b) son gentileza del Dr. Ralph Steinman y la Dra. Juliana Idoyaga, The Rockefeller University, Nueva York, Estados Unidos.

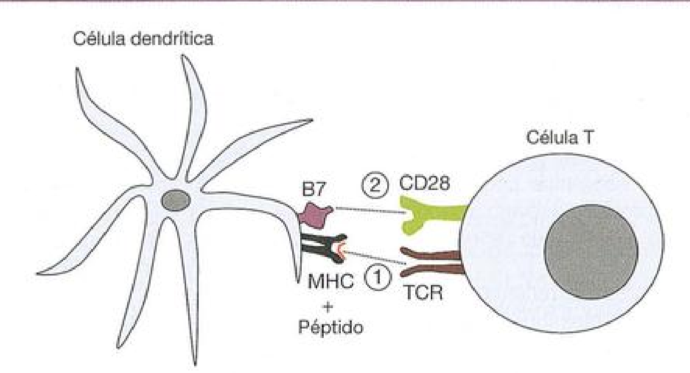


Figura 1.28. Las células dendríticas presentan el antígeno a las células T del sistema inmunitario adaptativo.

Las moléculas del CMH sobre las células dendríticas actúan como plataformas de aplicación para las proteínas desmembradas (es decir, péptidos). Las células T sólo pueden "ver" el antígeno cuando es presentado dentro de la hendidura de una molécula del CMH; esto representa la *señal 1*. Además de presentar el antígeno a las células T en el formato correcto, las células dendríticas también permitirán que las células T sufran expansión clonal (es decir, proliferación para aumentar su cantidad) mediante la provisión de señales coestimuladoras en la forma de ligandos de membrana, B7-1 y B7-2 (también denominadas CD80/CD86), que interaccionan con CD28 en la superficie de la célula T; esto representa la *señal 2*.

haremos una revisión rápida de los acontecimientos porque es importante que el lector comprenda el papel central de las células dendríticas en la inmunidad adaptativa desde el principio.

Las células dendríticas presentan el antígeno a las células T y les proporcionan señales coestimuladoras

Mientras que las células del sistema inmunitario innato pueden percibir directamente las moléculas no propias mediante su panoplia de PRR, los linfocitos T del sistema inmunitario adaptativo necesitan que el antígeno les sea "presentado" en un formato especial. Normalmente se trata de antígenos proteicos que son interiorizados y degradados en fragmentos peptídicos pequeños por una **célula presentadora de antígeno** (CPA), como una células dendríticas. La presentación del antígeno por la células dendríticas se logra a través de un complejo de membrana que se denomina **complejo mayor de histocompatibilidad**, que originalmente se descubrió por su función en el rechazo de injerto (de allí el nombre complejo). En esencia, las moléculas del CMH actúan como plataformas de aplicación para las proteínas desmembradas, y las células T sólo pueden "ver" al antígeno cuando se presenta dentro de la hendidura de una molécula del CMH; esto representa la **señal** 1 (Figura 1.28). Las células T inspeccionan al antígeno presentado por las células dendríticas mediante el uso de sus **receptores de células T** (TCR) que portan en su membrana y están especializados para el reconocimiento de complejos péptidos-CMH. La inducción exitosa de un TCR resulta en la activación y la adquisición de varias funciones relacionadas con la inmunidad por la célula T (véanse Capítulos 8 y 9). Aunque las células dendríticas son las CPA más eficientes para la presentación de antígenos a las células T, los macrófagos y las células B también puede realizar esta importante función.

Además de presentar el antígeno a las células T en el formato correcto, las células dendríticas también dan permiso para que las células T sufran la expansión clonal al proporcionarles **señales coestimuladoras** en la forma de ligandos de membrana, B7-1 y B7-2 (también llamado CD80/CD86), que interactúan con CD28 de la superficie de las células T; esto representa la **señal 2** (Figura 1.28).

La coestimulación (es decir, la señal 2) no es algo prioritario por parte de la células dendríticas, pero si está ausente, la célula T se niega a responder de la manera correcta y a menudo se autodestruirá a través de la muerte celular programada (apoptosis). Sólo para asegurarse de comprender perfectamente hasta aquí, dado que esto es fundamental para la activación del sistema inmunitario adaptativo, **las células T vírgenes requieren ambas señales, 1 y 2, de una CPA para convertirse correctamente en activas.**

La ocupación de los PRR prepara a las células dendríticas para que provean coestimulación

Debido a la necesidad de las señales 1 y 2 para la activación adecuada de las células T, saber cuándo proporcionar la coestimulación es una característica fundamental de la función de una CPA. El lector perspicaz se preguntará ahora cómo una célula dendrítica sabe cuándo brindar coestimulación debido a que en esencia esto determina si el sistema inmunitario adaptativo participará o no.

Una vez más, los PRR proporcionan la clave para saber cuándo el sistema inmunitario debe responder o no. Las células dendríticas sólo serán equipadas para emitir señales coestimuladoras tras la activación por un PAMP (o DAMP), que conducen a un aumento espectacular en la expresión de moléculas de superficie B7 en la célula dendrítica. La expresión de proteínas de las familias B7 también está controlada por NFκB, que se activa después de muchos PRR. Si las células dendríticas presentan el antígeno adquirido en ausencia de estimulación mediada por PAMP, es muy probable que las moléculas presentadas deriven de lo propio y, por lo tanto, no proporcionan las señales coestimuladoras adecuadas necesarias para activar las células T vírgenes (Figura 1.28).

El resultado final de todo esto es que el sistema inmunitario adaptativo depende en alto grado de las células del sistema inmunitario innato a efectos de saber cuándo iniciar una respuesta y cómo responder.

RESUMEN

La capacidad de reconocer y responder a lo "no propio", así como a los "propio oculto", es central para la inmunidad

- Las respuestas inmunitarias se inician a través de la detección de patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP) que representan lo no propio, o de patrones moleculares asociados con el peligro (DAMP) que representan lo propio oculto.
- Las moléculas de los receptores de reconocimiento de patrón (PRR), que pueden ser solubles (humorales) o asociadas a la célula, son utilizadas por el sistema inmunitario para detectar la presencia de PAMP o DAMP.
- La ocupación del PRR conduce a una diversidad de respuestas que están dirigidas a la destrucción directa o a la endocitosis por medio de la fagocitosis de los microorganismos y también produce la amplificación de las respuestas inmunitarias a través de la liberación de varias moléculas mensajeras, como citocinas y quimiocinas.

En los vertebrados actúan tres niveles de defensas inmunitarias

- La piel y las mucosas representan las barreras físicas contra la infección.
- El sistema inmunitario innato comprende un conglomerado de factores solubles y células que detectan y responden a los agentes infecciosos a través de la unión de estructuras relativamente inespecíficas (PAMP) comunes a muchos patógenos.
- El sistema inmunitario adaptativo está formado por linfocitos T y B que reconocen estructuras muy específicas (antígenos) de los microorganismos mediante distintos receptores de membrana que se generan al azar y se adaptan de una manera singular a los patógenos individuales.
- Las respuestas inmunitarias innatas contra la infección son rápidas (minutos), mientras que las respuestas inmunitarias adaptativas son tardías (días). Las respuestas inmunitarias innatas son, en términos generales, similares entre los

individuos dentro de una población y no mejoran con la exposición repetida a los agentes infecciosos. Las respuestas inmunitarias adaptativas difieren entre los individuos y mejoran tras un segundo encuentro u otro ulterior con el mismo antígeno.
- Las respuestas inmunitarias innata y adaptativa son interdependientes y cooperan para destruir a los agentes infecciosos.

Barreras contra la infección
- Los microorganismos son mantenidos fuera del cuerpo por la piel, la secreción de moco, la acción ciliar, la acción de lavado de los líquidos bactericidas (p. ej., lágrimas), el ácido gástrico y el antagonismo microbiano.
- Si se produce la penetración, las bacterias son destruidas por factores solubles como la lisozima y el complemento, así como por fagocitosis seguida de la digestión intracelular.

Las células fagocíticas reconocen y destruyen a los microorganismos
- Las principales células fagocíticas son los polimorfonucleares neutrófilos y los macrófagos.
- Las células fagocíticas usan sus receptores de reconocimiento de patrón (PRR) para reconocer patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP), que se hallan en la superficie del microorganismo, y adherirse a ellos.
- Los PRR incluyen los receptores de tipo Toll, de lectina de tipo C, de tipo NOD, similares a RIG y depuradores.
- La ocupación de PRR conduce a la activación de funciones fagocíticas y a la secreción de varias citocinas y quimiocinas, muchas de las cuales se expresan de una manera dependiente de NFκB e IRF.
- Los microorganismos que se adhieren a la superficie del fagocito activan el proceso de endocitosis y son internalizados por la célula, tras lo cual se fusionan con gránulos citoplasmáticos.
- A continuación se produce una serie formidable de mecanismos microbicidas: la conversión de O_2 en especies reactivas del oxígeno, la síntesis de óxido nítrico y la liberación de varios factores independientes del oxígeno a partir de los gránulos.
- La adherencia a los PRR en las células dendríticas inicia los procesos inmunitarios adaptativos (véase Capítulo 2).

El complemento facilita la fagocitosis y la lisis de microorganismos
- El sistema del complemento, una cascada enzimática desencadenada por múltiples componentes, se utiliza para atraer células fagocíticas hacia los microorganismos y endocitarlos. La activación del complemento también conduce a un complejo de ataque de membrana (MAC) que produce perforaciones en los microorganismos.
- En lo que se conoce como vía alternativa del complemento, el componente más abundante, C3, es escindido por una enzima convertasa formada a partir de su propio producto de escisión C3b y factor B, y es estabilizado para evitar la degradación causada por los factores H e I por asociación con la superficie microbiana. A medida que se produce, el C3b forma enlaces covalentes con el microorganismo y actúa como una opsonina.
- El componente siguiente, C5, se activa y produce un péptido pequeño, C5a; el C5b residual se une a la superficie y ensambla los componentes terminales C6-9 en un complejo de ataque de membrana que es muy permeable a solutos y puede conducir a la lisis osmótica.
- C5a es un potente agente quimiotáctico de neutrófilos, que además aumenta en gran medida la permeabilidad capilar.
- C3a y C5a actúan sobre los mastocitos e inducen la liberación de otros mediadores, como histamina, leucotrieno B4 y factor de necrosis tumoral (TNF), con efectos sobre la permeabilidad y la adhesividad de los capilares, y también sobre la quimiotaxis de los neutrófilos, a los que igualmente activan.

La respuesta inflamatoria
- Inflamación es el término utilizado para describir la serie de acontecimientos que rodean una respuesta inmunitaria y comprenden el edema local (debido al reclutamiento de fagocitos y proteínas plasmáticas desde la sangre), el eritema, el dolor y el aumento de la temperatura.
- Los productos de los mastocitos activados y la activación del complemento estimulan, en conjunto, la inflamación.
- Tras la activación del complemento con la consiguiente atracción y estimulación de los neutrófilos, los fagocitos activados se unen a los microorganismos recubiertos por C3b por sus receptores C3b de superficie y luego los pueden ingerir. El ingreso de polimorfonucleares y el aumento de la permeabilidad vascular constituyen la poderosa **respuesta inflamatoria aguda** (Figura 2.18).
- La inflamación también puede ser iniciada por los macrófagos tisulares, con función similar a los mastocitos, dado que la señalización por toxinas bacterianas y bacterias recubiertas por C5a o iC3b que se adhieren a los receptores del complemento superficiales induce la liberación de factores quimiotácticos y activadores de neutrófilos.

Mecanismos humorales que proporcionan una segunda estrategia defensiva
- Muchas moléculas solubles de reconocimiento de patrones de diferentes familias (p. ej., pentaxinas, colectinas, ficolinas) sirven para detectar PAMP conservados en los microorganismos. Los mecanismos de acción comunes a estos PRR solubles incluyen la opsonización, la activación del complemento, la captación fagocítica y la aglutinación.
- Además de la lisozima, las defensinas y el sistema del complemento, todas defensas humorales incluyen las proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva y la proteína de unión a manosa. La lectina de unión a manosa genera una vía del complemento que difiere de la vía alternativa en las primeras reacciones, como veremos en el Capítulo 2. Es un miembro de la familia de las colectinas que incluye la conglutinina y los surfactantes SP-A y SP-D, notables por su capacidad de distinguir entre los grupos de hidratos de carbono de los microbios y los "propios" por sus moléculas de reconocimiento de patrones.
- La recuperación de las infecciones virales puede verse afectada por los interferones que bloquean la replicación viral.+

Las células *natural killer* a las células anormales o a las infectadas por virus a que comiencen la apoptosis
- Las células NK pueden identificar células propias que expresan proteínas anormales o patrones alterados.
- Una vez seleccionadas las células diana adecuadas, las NK pueden destruirlas a través de su receptor de apoptosis o mediante una vía de gránulos citotóxicos para que comiencen su apoptosis.
- Tanto la vía del receptor de apoptosis como la de los gránulos citotóxicos implican la activación de un grupo de proteasas, llamadas captasas, dentro de las células diana que coordinan el desmantelamiento de estructuras internas vitales y producen finalmente la muerte celular.

Los parásitos intracelulares grandes

- Los agentes infecciosos grandes que son físicamente demasiado grandes y no pueden ser fagocitados por los macrófagos o los neutrófilos son bombardeados con enzimas nocivas por los eosinófilos.
- La destrucción extracelular por parte de los eosinófilos unidos a C3b puede impedir que muchos parásitos grandes establezcan una "cabeza de playa" en el huésped.

El sistema inmunitario innato estimula la inmunidad adaptativa

- Las células dendríticas son un mediador entre los sistemas inmunitarios innato y adaptativo al presentar el antígeno a los linfocitos T dentro de los ganglios linfáticos.
- Las células dendríticas maduras presentan fragmentos peptídicos de antígenos a las células T por medio de las moléculas de superficie del CMH (señal 1) y también proveen señales coestimuladoras por medio de ligandos de la familia B7 (señal 2). Se requieren ambas señales para la activación eficiente de la célula T.
- La estimulación de las células dendríticas mediada por PAMP causa su maduración (es decir, la capacidad de presentar el antígeno de modo eficiente y proporcionar coestimulación), y favorece su migración hacia los ganglios linfáticos.

LECTURAS ADICIONALES

Banchereau J. & Steinman R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. Nature 392, 245–252.

Bottazzi B., Doni A., Garlanda C. & Mantovani A. (2010) An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. Annual Review of Immunology 28, 157–183.

Creagh E.M. & O'Neill L.A. (2006) TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. Trends in Immunology 8, 352–357.

Cullen S.P. & Martin S.J. (2008) Mechanisms of granule-dependent killing. Cell Death & Differentiation 15, 251–262.

Delves P.J. & Roitt I.M. (2000) The immune system: first of two parts. New England Journal of Medicine 343, 37–49.

Janeway C.A. Jr & Medzhitov R. (2002) Innate immune recognition. Annual Review of Immunology 20, 197–216.

Matzinger P. (1994) Tolerance, danger, and the extended family. Annual Review of Immunology 12, 991–1045.

Matzinger P. (2002) The danger model: a renewed sense of self. Science 296, 301–305.

Medzhitov R. (2008) Origin and physiological roles of inflammation. Nature 454, 428–35.

Meylan E., Tschopp J. & Karin M. (2006) Intracellular pattern recognition receptors in the host response. Nature 442, 39–44.

Ricklin D. & Lambris J.D. (2007) Complement-targeted therapeutics. Nature Biotechnology 25, 1265–1275.

Sayed B.A., Christy A., Quirion M.R. & Brown M.A. (2008) The master switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance. Annual Review of Immunology 26, 705–739.

Steinman R.M. & Idoyaga J. (2010) Features of the dendritic cell lineage. Immunological Reviews 234, 5–17.

Tamura T., Yanai H., Savitsky D. & Taniguchi T. (2008) The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. Annual Review of Immunology 26, 535–584.

Taylor R.C., Cullen S.P. & Martin S.J. (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. Nature Reviews Molecular Cell Biology 9, 231–241.

CAPÍTULO 2

Inmunidad adquirida específica

Conceptos clave

A modo de resumen...

Los neutrófilos, los eosinófilos, los basófilos, los mastocitos, los monocitos, los macrófagos, las células dendríticas y las células *natural killer* (NK) son todos los componentes celulares de la respuesta innata. Las moléculas que participan en las respuestas innatas incluyen las proteínas de fase aguda y el complemento. Si bien las respuestas innatas son crucialmente importantes en la protección contra patógenos, ellas no se ajustan a antígenos particulares y no mejoran tras los encuentros repetidos con el agente infeccioso, a diferencia de las respuestas adquiridas que ahora vamos a explorar.

Introducción

Nuestros adversarios microbianos tienen oportunidades notables para desarrollar estrategias que les permitan evadir nuestras defensas inmunitarias innatas. Muchas bacterias pueden dividirse cada 20-60 minutos o menos, y la replicación de su ácido nucleico proporciona una oportunidad para que se produzcan mutaciones que pueden causar cambios en las estructuras (antígenos) reconocidas por el sistema inmunitario. Los virus y los parásitos también alteran constantemente sus antígenos mediante mutación u otros mecanismos. Obviamente el cuerpo necesita "diseñar" mecanismos de defensa que puedan seguir el ritmo con todos estos cambios. En otras palabras, el cuerpo necesita tener a su disposición una cantidad muy importante de **defensas inmunitarias específicas**, lo cual representa todo un desafío.

Roitt's Essential Immunology, Twelfth Edition. Peter J. Delves, Seamus J. Martin, Dennis R. Burton, Ivan M. Roitt.

Antígenos: "formas" reconocidas por el sistema inmunitario

Las estructuras que son reconocidas por la respuesta inmunitaria adquirida específica se denominan antígenos. Éstos poseen una forma que es complementaria de la de los receptores para el antígeno de las células del sistema inmunitario y de las moléculas de anticuerpos secretadas. Los antígenos pueden ser proteínas, hidratos de carbono, lípidos, ácidos nucleicos, pequeñas agrupaciones químicas conocidas como haptenos (de hecho, prácticamente todo). Los antígenos pueden ser un componente de microorganismos, de agentes infecciosos grandes como gusanos parásitos, de sustancias ingeridas como alimentos, de sustancias inhaladas como pólenes, de órganos o tejidos trasplantados, o incluso componentes de nuestros propio cuerpo (antígenos "propios").

Anticuerpo: una molécula de reconocimiento específica para el antígeno

Los procesos evolutivos generaron lo que se puede describir como una solución brillante para el problema de reconocer una diversidad casi infinita de antígenos. Esta solución fue crear una molécula no sólo capaz de reconocer específicamente el patógeno agresor sino también de reclutar varios componentes de la respuesta inmunitaria. ¡*Voilà*, la molécula de anticuerpo!

Los anticuerpos tienen dos partes principales; una, llamada región variable, dedicada a la unión con el antígeno individual (función de reconocimiento de antígeno) y otra, la región constante, que se une al complemento, los fagocitos, las células NK, etc. (función efectora). Así, el cuerpo tiene que formar cientos de miles (o incluso millones) de **moléculas de anticuerpos con sitios diferentes de reconocimiento para el antígeno**, pero que comparten la propiedad de reclutar otros elementos de la respuesta inmunitaria (Figura 2.1).

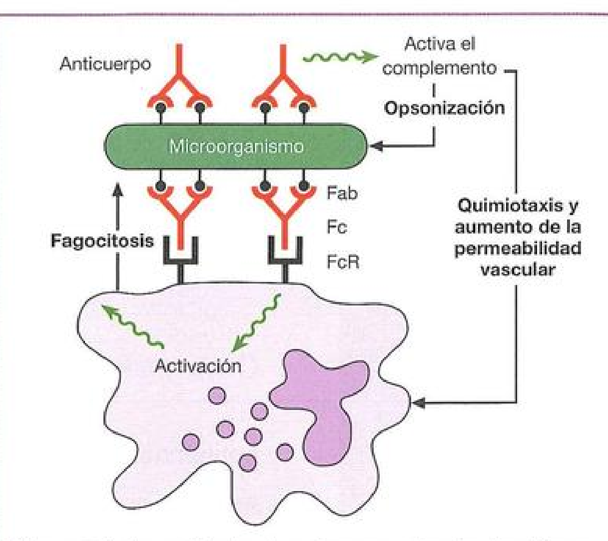


Figura 2.1. La molécula de anticuerpo vincula el antígeno con otros componentes de la respuesta inmunitaria.

La porción Fab (fragmento de unión al antígeno) del anticuerpo se une al antígeno específico del microorganismo y varía de un anticuerpo a otro. La porción Fc (fragmento cristalizable) es idéntica para todos los anticuerpos de la misma clase o subclase, y activa funcionalmente el complemento (anticuerpos IgM e IgG, a través de la vía clásica) y las células fagocíticas (anticuerpos IgG, por la unión a los receptores Fc [FcR] sobre la superficie del fagocito). La activación del complemento conduce a la opsonización de microorganismos para reforzar su reconocimiento por los fagocitos (debido a la cobertura del microorganismo con complemento, que es reconocido por los receptores para el complemento sobre el fagocito [no mostrado, véase la Figura12.10]). Además, la activación del complemento conduce a la atracción quimiotáctica de los fagocitos al sitio de la infección y al aumento de la permeabilidad vascular con el fin de facilitar su pasaje desde la circulación sanguínea hacia los tejidos. Otras actividades de los anticuerpos no mostradas aquí consisten en proporcionar un enlace entre las células *killer* (células NK, eosinófilos, etc.) y el patógeno, un mecanismo denominado citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA).

Los anticuerpos pueden activar la vía clásica del complemento

Los anticuerpos humanos se dividen en 5 clases principales: inmunoglobulina M (IgM), IgG, IgA, IgE e IgD, que difieren en la especialización de sus "extremos" efectores para las diferentes funciones biológicas. En el Capítulo 1 describimos la vía alternativa del complemento independiente del anticuerpo que se basa en los polisacáridos microbianos para su activación. Sin embargo, la primera vía del complemento que se descubrió, la **vía clásica**, requería de anticuerpos IgM o IgG para su activación. Los anticuerpos de estas dos clases, cuando se unen al antígeno, se vinculan con la primera molécula en la vía clásica del complemento, Clq, y desencadenan la actividad proteolítica latente del complejo C1 (Figura 2.2).

La fracción C1q es un hexámero dispuesto en un cuerpo central, similar al colágeno, ramificado en 6 brazos que en cada punta tienen una cabeza globular que se une al anticuerpo. C1q se asocia con 2 subunidades más, C1r y C1s, en un complejo trimolecular estabilizado por el Ca^{2+} (Figura 2.2). Estas dos moléculas contienen las denominadas repeticiones "sushi" de una unidad plegada de 60 aminoácidos como un dominio globular y a menudo conocida como proteína de control del complemento (CCP, *complement control protein*) debido a que es una característica estructural de varias proteínas implicadas en el control del sistema de complemento. Los cambios que se producen en C1q tras la unión con el complejo antígeno-anticuerpo logran la autoactivación de la actividad proteolítica de C1r que después escinde C1s. La actividad de C1 está regulada por un inhibidor de C1 (C1-Inh) que se une a Clr_2–$C1s_2$ y determina la disociación de C1q y, por esto, evita la activación excesiva de la vía clásica.

El próximo componente de la cadena, C4 (es de lamentar que los componentes se hayan numerado antes de establecer la secuencia), ahora se fija a C1 por medio de esas CCP, y es escindido de manera enzimática por acción de $\overline{C1s}$. Como es de esperar en una cascada donde participan múltiples enzimas, varias moléculas de C4 sufren escisión, y cada una

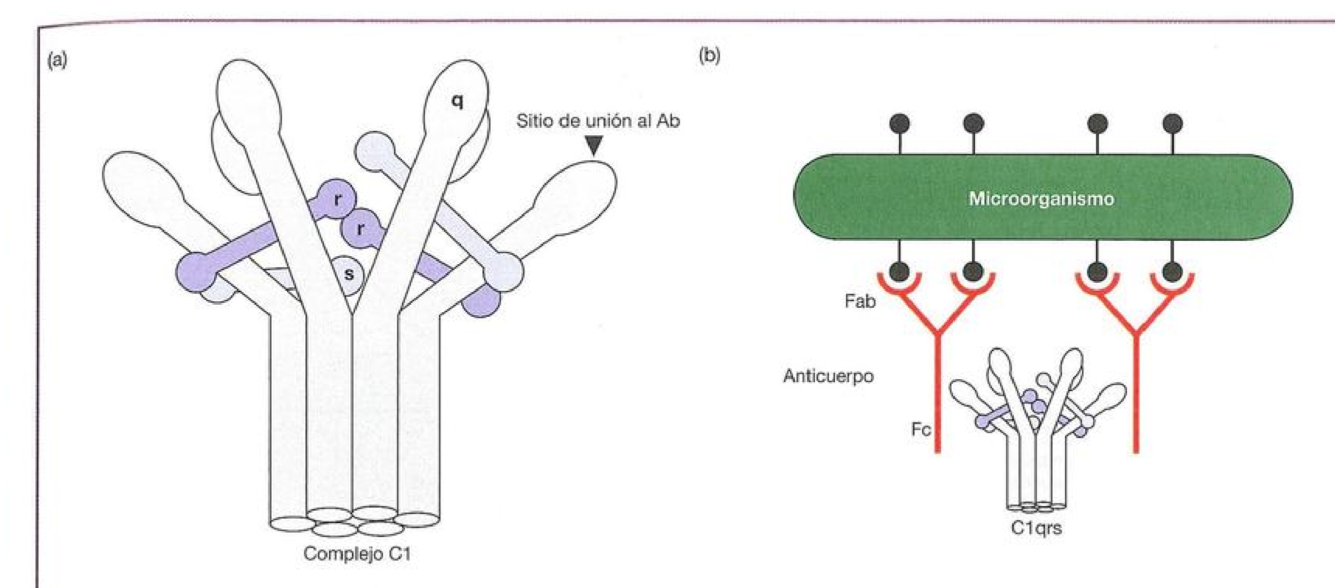


Figura 2.2. Activación de la vía clásica del complemento.

El primer componente, C1 , de la vía clásica de activación del complemento es un complejo compuesto por tres subunidades: C1q, C1r y C1s. a) C1q forma un hexámero dispuesto como una estructura similar a un "ramo de tulipanes" y se asocia con el complejo flexible, similar a un bastón y dependiente del Ca $C1r_2$-$C1s_2$, que se interdigita con los 6 brazos de C1q. b) La activación de la cascada del complemento por la vía clásica requiere que los anticuerpos estén unidos al antígeno de modo que las cabezas globulares del hexámero de C1q puedan unirse a la porción Fc de al menos dos anticuerpos.

de ellas libera un pequeño fragmento C4a y revela un enlace tioléster interno lábil naciente en el $\overline{C4b}$ residual similar al de C3 (véase Figura 1.17), que entonces se puede unir al complejo anticuerpo-C1 o a la superficie del microorganismo. En presencia de Mg^{2+}, C2 puede formar un complejo con $\overline{C4b}$ y transformarse en nuevo sustrato para $\overline{C1s}$; el producto obtenido $\overline{C4b2a}$ tiene ahora la actividad vital de C3 convertasa requerida para escindir C3 (Figura 2.3).

La vía clásica de C3 convertasa presenta la misma especificidad que el $\overline{C3bBb}$ generado por la vía alternativa. La activación de un único complejo C1 puede inducir la proteólisis de miles de moléculas de C3. El C3b resultante se agrega a una molécula de $\overline{C4b2a}$ para transformarlo en una enzima C5 convertasa, que genera C5a, con funciones quimiotácticas y anafilácticas, y C5b, que forma el primer componente del **complejo de ataque de membrana** (Figuras 1.19 y 2.4). Así como la vía alternativa de la C3 convertasa es controlada por los factores H e I, la degradación de $\overline{C4b2a}$ se logra por el factor I en presencia de la proteína de unión a C4 (C4bp) o de un receptor C3b de la superficie celular (CR1) que actúan como cofactores.

Las vías de la lectina y clásica del complemento confluyen para generar la misma C3 convertasa

En este momento es adecuado recordar la activación del complemento por los mecanismos inmunitarios innatos que comprenden la lectina de unión a manosa (MBL, *mannose-binding protein*). Cuando forma un complejo con el microorganismo, la MBL se une e induce la actividad proteolítica latente de las serinproteasas asociadas con MBL, MASP-1 y MASP-2, que desde el punto de vista estructural se asemejan a C1r y C1s, respectivamente. De una manera muy similar al complejo $C1\overline{qrs}$, MASP-1 y MASP-2 escinden C4 y C2 para generar la $\overline{C4b2a}$ C3 convertasa.

Más allá de si la activación se produce por la vía clásica, la vía de la lectina o la vía alternativa, se generan varios componentes biológicamente activos del complemento que tienen funciones importantes en la respuesta inmunitaria (Figura 2.5).

Los anticuerpos pueden ayudar a la fagocitosis

A veces, los microorganismos pueden resistir la fagocitosis. Si se añaden pequeñas cantidades de anticuerpos, el fagocito entra en acción. Lo hace mediante el reconocimiento de dos o más moléculas de anticuerpos unidas al microorganismo mediante receptores Fc especializados localizados en la superficie celular del fagocito (Figura 2.1).

No es suficiente una sola molécula de anticuerpo que forme un complejo con el microorganismo debido a que no alcanza a producir el entrecruzamiento de los receptores Fc en la membrana de superficie del fagocito requerido para activar la célula. Hay una consideración adicional relacionada con lo que se suele denominar **efecto de bonificación de la multivalencia**. Por razones termodinámicas que se analizarán en el Capítulo 5, la asociación constante de ligandos, que utiliza varios enlaces en lugar de uno solo para reaccionar con los receptores, presenta un incremento geométrico en lugar de aritmético. Por ejemplo, tres anticuerpos unidos muy cerca entre sí sobre una bacteria serán atraídos por un macrófago con una fuerza mil veces mayor que una sola molécula de anticuerpo (Figura 2.6).

Vías clásica y de lectina
Vía alternativa
Anticuerpo
MBL
Complejo anticuerpo microorganismo
C1qrs
C1qrs
MASP-1/2
MASP-1/2
Complejo microorganismo -MBL
C4b2a
C4b2
C4
C4b
C2
Polisacárido microbiano
C3
Properdina
C3bBb
Factor D
C3bB
Factor B
C3a & C3b
C4b2a3b
C5
C3bBb3b
C5a & C5b
C6, C7, C8, C9
C5b-C9

Figura 2.3. Comparación de las vías alternativa, clásica y de lectina del complemento.

La vía clásica es activada por el anticuerpo, no así la vía alternativa y la de lectina. En celeste se destacan las moléculas con actividad de proteasa. El acontecimiento clave central de las tres vías es la escisión de C3 por la C3 convertasa (concretamente C4b2a para las vías clásica y de lectina, y C3bBb para la vía alternativa). Es importante evitar confusiones con la nomenclatura empleada; el fragmento más grande C2 que forma la C3 convertasa se denomina C2a, pero para ser consecuente con C4b, C3b y C5b hubiera sido más razonable denominarlo C2b. Obsérvese que al unirse a la fosforilcolina microbiana, la proteína C reactiva (p. 24) puede iniciar la vía clásica. Cuando la lectina de unión a manosa (MBL) se combina con los hidratos de carbono de la superficie microbiana, se asocia con las serinproteasas MASP-1 y MASP-2 (p. 25), que dan por escisión C4 y C2.




Bases celulares de la producción de anticuerpos

Los anticuerpos son elaborados por los linfocitos

La mayoría de los **linfocitos** en reposo son células pequeñas con núcleo muy teñido debido a la cromatina condensada y un citoplasma relativamente escaso que contiene alguna que otra mitocondria requerida para la provisión básica de energía (Figuras 2.7 y 2.8)

Los trabajos de James Gowans establecieron en gran medida la función central del **linfocito pequeño** en la producción de anticuerpos. Este autor indujo la depleción de linfocitos en ratas mediante el drenaje crónico de linfa por medio de una cánula insertada en el conducto torácico, y demostró que los animales presentaban un deterioro notable en la capacidad de montar una respuesta de anticuerpos frente al ataque microbiano. Esta capacidad de formar anticuerpos podía restablecerse mediante la inyección de linfocitos en el conducto torácico obtenidos de otra rata. El mismo efecto se lograba si, antes de la inyección, las células del conducto torácico se incubaban a 37°C durante 24 horas bajo condiciones que eliminaban las células de tamaño grande y mediano, y sólo dejaban los linfocitos pequeños. Así se demuestra que el linfocito pequeño es necesario para la **respuesta de anticuerpos**.

Los linfocitos pequeños pueden marcarse si se inyecta con anterioridad timidina radioactiva tritiada [^{3}H] a la rata donante; entonces se torna posible seguir el destino de estos linfocitos cuando se transfieren a otra rata de la misma cepa que es inyectada con microorganismos para producir res-

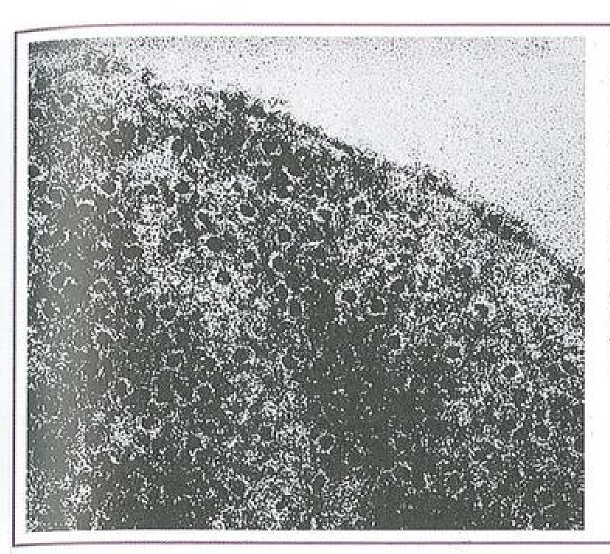


Figura 2.4. Lesiones múltiples en la pared celular de la bacteria *Escherichia coli* causadas por la interacción con anticuerpos IgM y complemento.

Cada lesión es producida por una sola molécula de IgM y se presenta como una "depresión oscura" a causa de la penetración por la "tinción negativa". En realidad se trata de una ilusión, pues estas depresiones son como cráteres volcánicos que se yerguen soberbios en la superficie, y cada uno es un complejo de "ataque de membrana". Se pueden obtener resultados comparables en ausencia de anticuerpos debido a que la endotoxina de la pared celular puede activar la vía alternativa en presencia de una mayor concentración de suero (×400.000). (Cortesía de R. Dourmashkin y J.H. Humphrey).

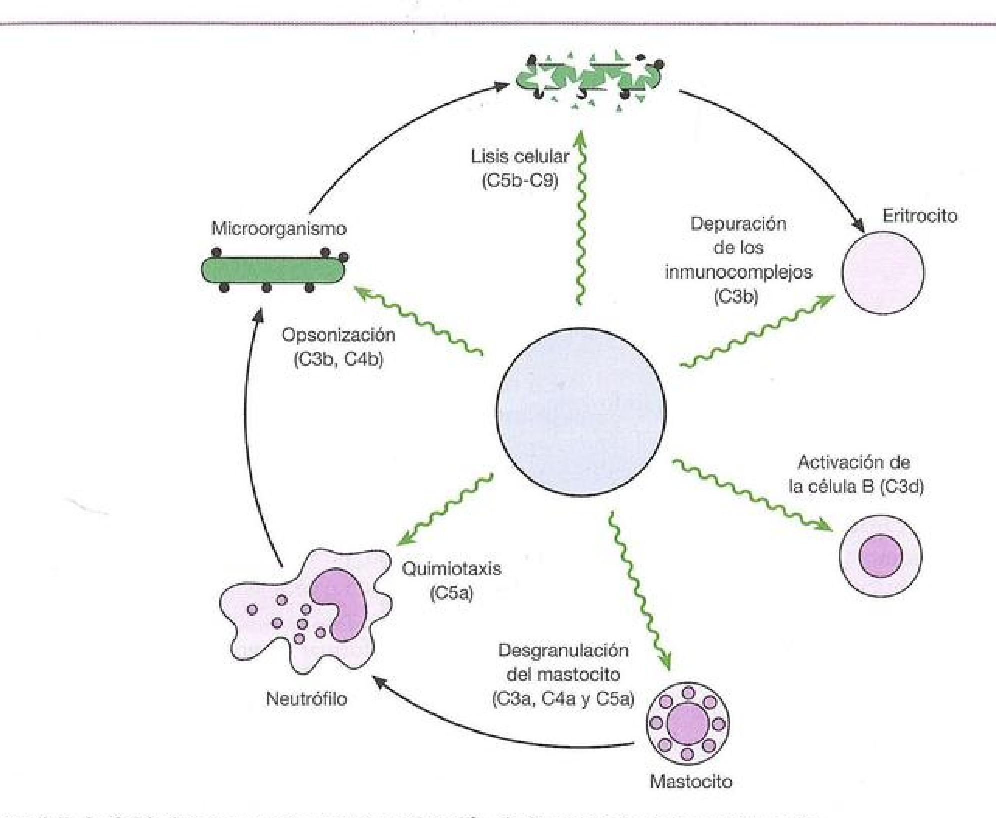


Figura 2.5. Actividades generadas por la activación de la cascada del complemento.

Tras la escisión de C3 por la C3 convertasa y la ulterior de C5 por la C5 convertasa, se generan varios componentes del complemento biológicamente activos. Ciertas células del sistema inmunitario poseen receptores celulares de superficie para componentes particulares del complemento, y las superficies de las células microbianas se recubren con complemento. Las funciones que se generan actúan en conjunto para producir una respuesta inmunitaria eficaz. Así, la liberación de mediadores inflamatorios por los mastocitos que se producen en respuesta a los componentes C3a y C5a del complemento (y en menor medida, C4a) conduce a un aumento de permeabilidad vascular. Esto permite que los neutrófilos migren de la circulación en respuesta a una actividad adicional de C5a como un factor quimiotáctico para los neutrófilos. Los microorganismos recubiertos ("opsonizados") con C3b y C4b son efectivamente fagocitados por estos neutrófilos debido a que los fagocitos expresan receptores de complemento.

Una vez que C3b se deposita en la superficie microbiana, los componentes terminales (C5b-C9) del sistema del complemento pueden formar el complejo de ataque de membrana (MAC) con la destrucción ulterior de microorganismos. Dado que los eritrocitos poseen receptores para el complemento son capaces de unirse a antígenos que están recubiertos por el complemento, y éstos son transportados con rapidez al hígado y al bazo para su destrucción. El componente C3d facilita la activación de las células B, o bien, la coestimulación a través de receptores de complemento en la célula B o por mediación de la retención de inmunocomplejos en las células dendríticas foliculares, y con ello participa en la generación de un anticuerpo específico contra el microorganismo.

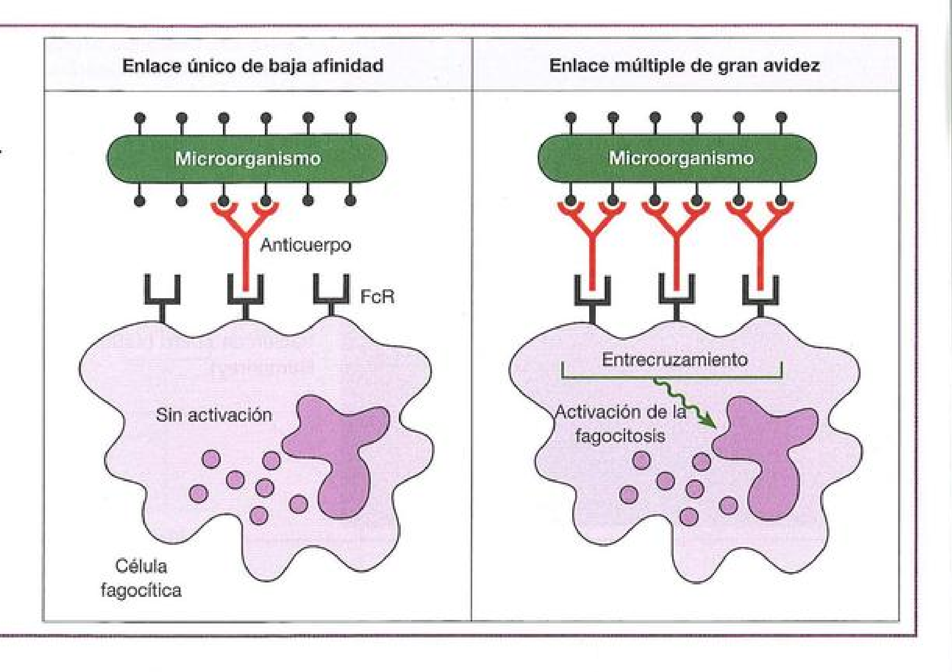


Figura 2.6. La unión de la bacteria al fagocito por medio de numerosos anticuerpos crea fuerzas intensas de asociación y activa la fagocitosis por la formación de entrecruzamientos con los receptores Fc de superficie (FcR).

puesta de anticuerpos (Figura 2.9). Después del contacto con los microorganismos inyectados, algunos de los linfocitos marcados transferidos evolucionan a **plasmocitos** (Figuras 2.7d y 2.10), que contienen (Figura 2.7e) y secretan anticuerpos.

El antígeno selecciona los linfocitos que elaboran anticuerpos

Los linfocitos son de dos variedades principales, los **linfocitos** T (células T) y los **linfocitos B** (células B). Si bien los linfocitos T (llamados así porque se diferencian en el timo) tienen varias funciones, sólo los linfocitos B (que se diferencian en la médula ósea) son capaces de formar anticuerpos para generar la **inmunidad humoral**. Cada célula B está programada para elaborar un anticuerpo, y sólo uno, al que coloca en una versión transmembrana sobre su superficie celular para actuar como receptor para el antígeno específico. Estos anticuerpos pueden ser detectados mediante el uso de sondas fluorescentes, y en la Figura 2.7b se observan las moléculas de anticuerpo sobre la superficie de un linfocito B humano teñido con un antisuero fluorescente de conejo producido contra una preparación de anticuerpos humanos. Cada linfocito B tiene moléculas de anticuerpos en el orden de 10^5 en su superficie, todas con idéntica especificidad para el antígeno.

Cuando un antígeno ingresa en el cuerpo se enfrenta con una serie deslumbrante de linfocitos B, cada uno portador de anticuerpos diferentes y con su propio sitio de reconocimiento. El antígeno sólo se unirá a los receptores con los que se adapte bien. Los linfocitos B cuyos receptores tienen unido el antígeno reciben una señal de activación y se desarrollan como plasmocitos secretores de anticuerpos. Como los linfocitos están programados para elaborar sólo una especificidad de anticuerpo, la versión soluble de la molécula de anticuerpo secretada reconocerá el mismo antígeno que la versión transmembrana de superficie que originalmente actúa como receptor para el antígeno. De este modo, el antígeno selecciona los anticuerpos que lo reconocen con eficacia (Figura 2.11). Las células T con un TCR de especificidad adecuada son seleccionadas de manera similar; algunas de ellas son células T *helper* necesarias, en la mayoría de los casos para ayudar a que las células B proliferen y después de diferencien en plasmocitos.

La necesidad de expansión clonal implica que la inmunidad humoral debe ser adquirida

Dado que se pueden elaborar cientos de miles, y quizás incluso millones de moléculas de anticuerpo diferentes, es imposible mantener muchos linfocitos productores de cada tipo de anticuerpo; no habría espacio suficiente en el cuerpo para albergarlos. En compensación, los linfocitos estimulados por contacto con el antígeno sufren ondas sucesivas de proliferación para formar un gran clon de plasmocitos capaces de elaborar la clase de anticuerpo para el que fue programado el linfocito original. Por medio de este sistema de **selección clonal** se pueden producir concentraciones de anticuerpo suficientes como para combatir la infección con eficacia (Avances y descubrimientos 2.1; Figura 2.12). La selección clonal de los linfocitos T asegura, de manera similar, que sólo las células de la especificidad apropiada son inducidas a proliferar.

La capacidad de los agentes antimitóticos para suprimir completamente la producción de anticuerpos ante determinado estímulo antigénico destaca la importancia de la proliferación para el desarrollo de una respuesta de anticuerpos significativa.

Como se requiere cierto tiempo para que un clon en proliferación alcance la cantidad suficiente de anticuerpo, por lo general transcurren varios días hasta detectarlo en el suero tras el contacto primario con el antígeno. Los anticuerpos recién formados son consecuencia de la exposición al antígeno, por lo cual se habla de **respuesta inmunitaria adquirida (adaptativa)**.

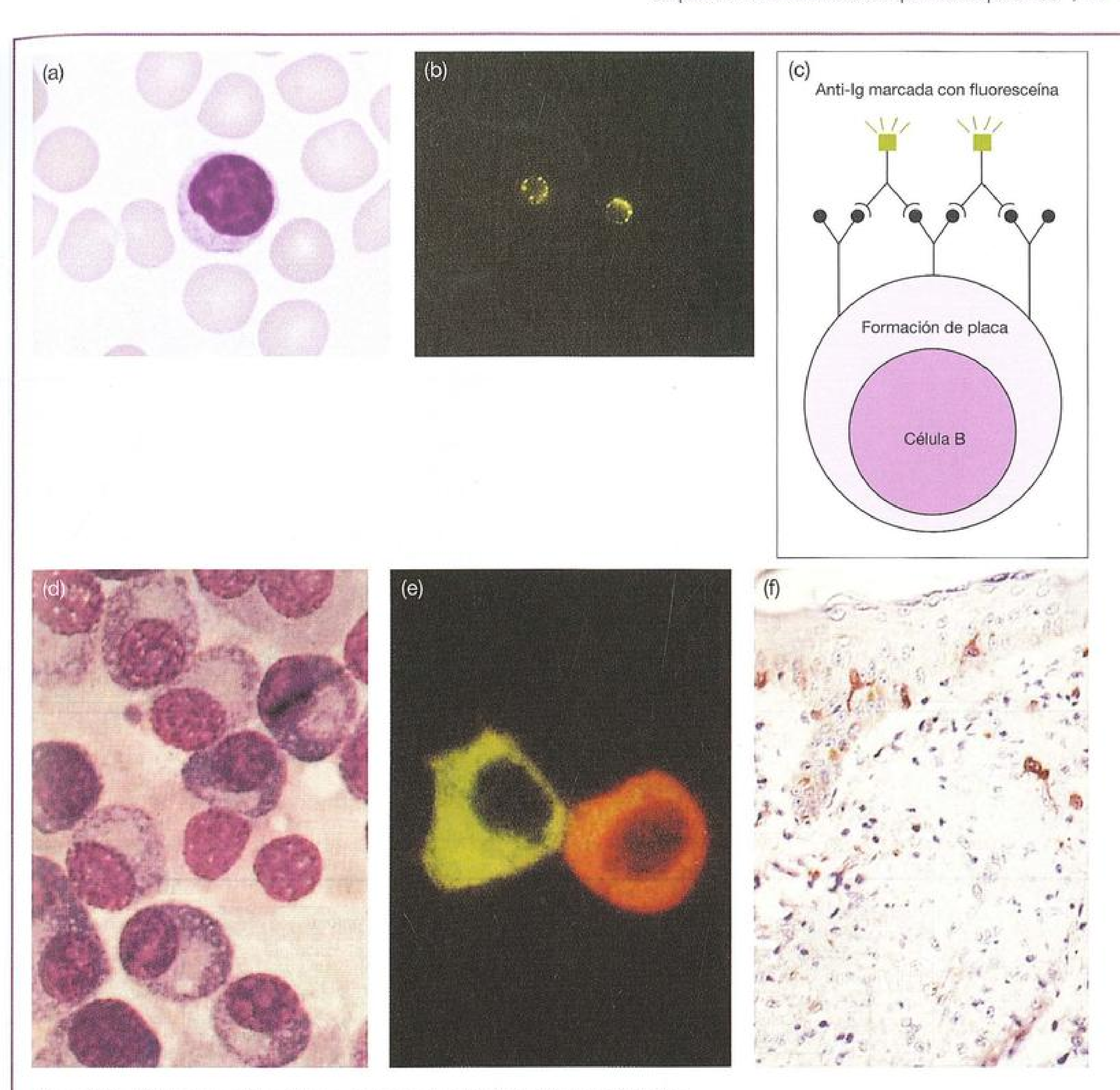
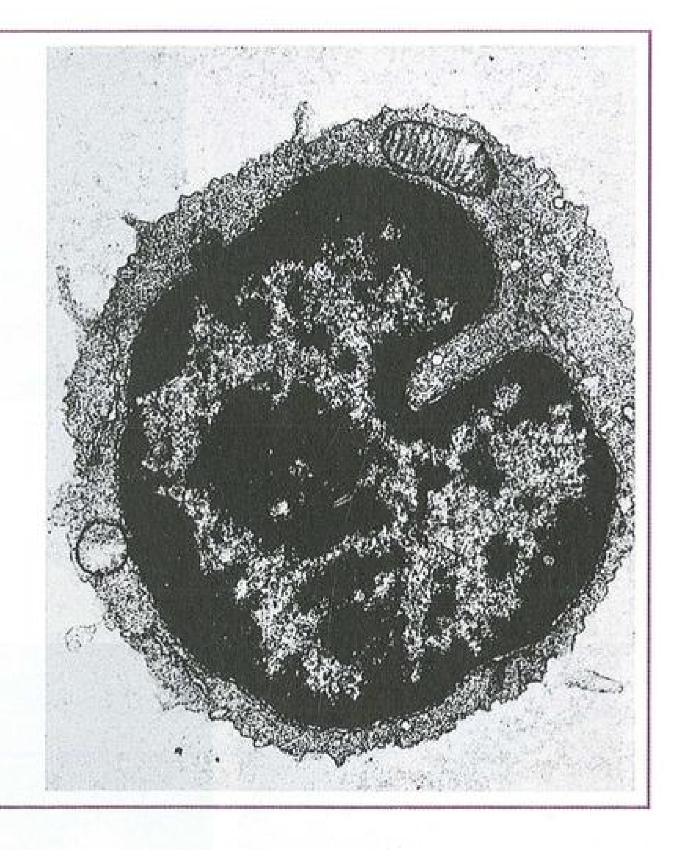


Figura 2.7. Células que intervienen en la respuesta inmunitaria adquirida.

a) **Linfocitos pequeños.** Típico linfocito T en reposo, con escaso margen de citoplasma. La cromatina condensada origina una tinción intensa del núcleo. Tinción de Giemsa. b) Tinción por inmunofluorescencia de la **inmunoglobulina de superficie del linfocito** B usando anti-Ig conjugada con fluoresceína (verde). Si la reacción se lleva a cabo en frío para impedir la pinocitosis, el anticuerpo marcado no puede penetrar en el interior de los linfocitos viables y sólo reacciona con los componentes de superficie. Se distinguen placas agregadas de Ig de superficie que comienzan a formar un casquete o capuchón en el linfocito de la derecha. Durante la formación del casquete, la miosina submembranosa se distribuye junto con la Ig de superficie. c) Representación diagramática de la formación de la placa observada en b). d) **Plasmocitos.** El núcleo es excéntrico y el citoplasma es intensamente basófilo debido al alto contenido de RNA. La zona yuxtanuclear poco teñida corresponde a la región del Golgi. May-Grünwald-Giemsa. e) **Plasmocitos** teñidos para mostrar la inmunoglobulina intracelular utilizando una anti-Ig marcada con fluoresceína (verde) y una anti-IgM conjugada con rodamina (rojo). f) **Células de Langerhans**, las células dendríticas interdigitadas de la piel humana en la lepra, incrementadas en la zona subepidérmica, quizá como consecuencia del proceso patológico. Están teñidas de rojo por el método de inmunoperoxidasa con anticuerpos contra la proteína de unión al calcio S-100, presente en las células de Langerhans (y por esto un "marcador" para ella). (La fotografía a) es reproducida de *Essential Haematology* 5th ed por gentileza de los autores A.V. Hoffbrand, J.E. Pettit y P.A.H. Moss; b) por P. Lydyard; d) y e) por C. Grossi; y f) por M. Ridley).

Figura 2.8. Ultraestructura de un linfocito.

Linfocito T con núcleo indentado que contiene cromatina condensada y citoplasma disperso: se observa una sola mitocondria y muchos ribosomas libres, pero escasos orgánulos (×13.000). En esencia, los linfocitos B son similares, con algo más de citoplasma y ocasionales elementos del retículo endoplasmático rugoso. (Cortesía de A. Zicca).



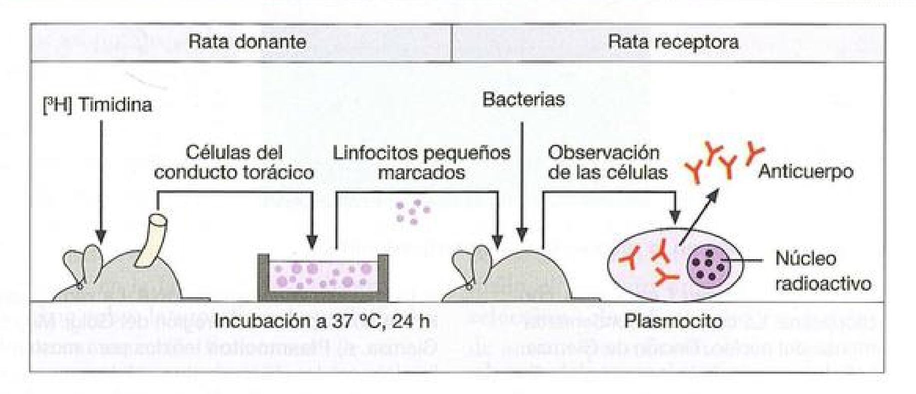


Figura 2.9. Los linfocitos pequeños pueden activarse para diferenciarse en plasmocitos secretores de anticuerpos.

En este sistema experimental, los linfocitos de la rata donante son marcados en forma radiactiva *in vivo* con timidina tritiada [^{3}H] y luego extraídos desde el conducto torácico (una estructura anatómica que conecta las circulaciones linfática y sanguínea y, por consiguiente, es una gran fuente de linfocitos circulantes (véase Figura7.4). Tras la incubación en ciertas condiciones *in vitro* durante 24 horas, es posible obtener una población de linfocitos a partir de la cual se han deplecionado algunas células ya activadas (y por consiguiente, más grandes). Los linfocitos pequeños marcados con ^{3}H (que tendrán un espectro diferente de especificidades antigénicas) son luego transferidos a una rata receptora, que es inmunizada con una cepa de bacterias. Cualquier linfocito pequeño con especificidad para esta cepa bacteriana se convertirán en activados y algunas de éstas serán linfocitos B capaces de diferenciarse en plasmocitos. Esta observación está provista por el hecho de que las células de origen donante (es decir, con un núcleo radioactivo mostrado por autorradiografía) también pueden mostrar que poseen anticuerpos intracelulares revelados por medio de tinción con sondas fluorescentes (véase Figura 2.7e) y los secretan *in vitro*.

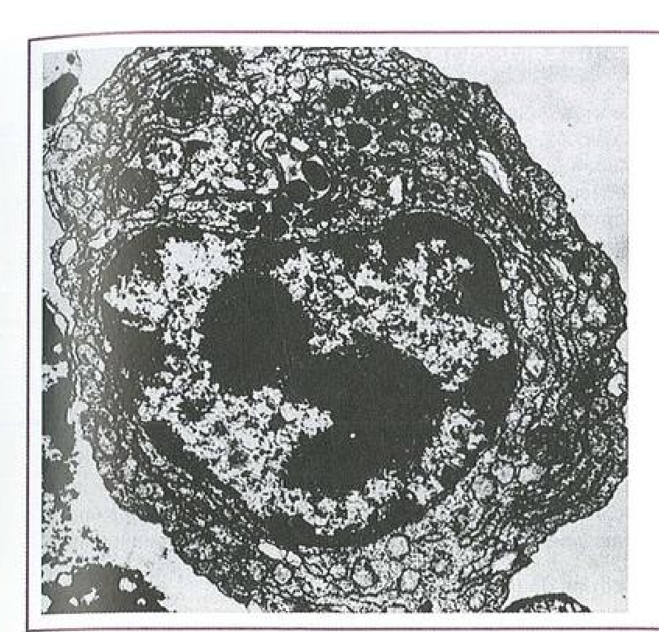


Figura 2.10. Plasmocito (x10.000).

Abundante cantidad de retículo endoplasmático rugoso asociado con la síntesis y la secreción de Ig.

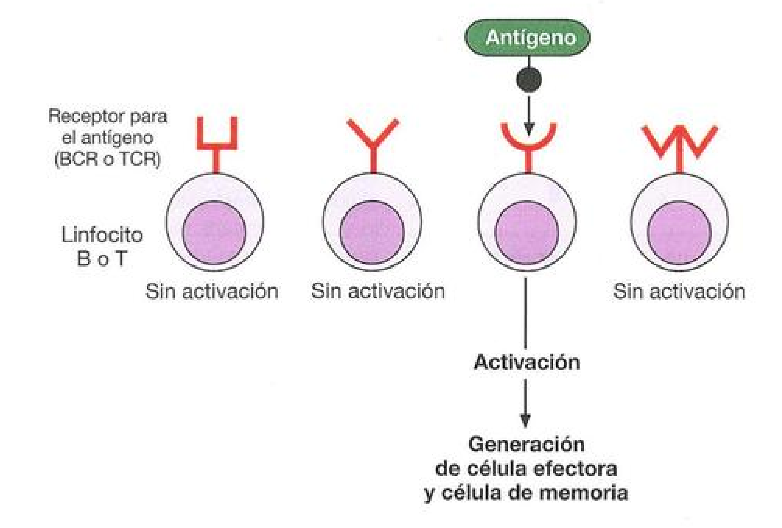


Figura 2.11. El antígeno activa aquellos linfocitos con un receptor para el antígeno complementario.

Este proceso se denomina selección clonal y asegura que sólo son activados los linfocitos importantes específicos para el antígeno para producir las células efectoras y las células de memoria adecuadas. En el caso de los linfocitos B productores de anticuerpos, ellos utilizan una versión de anticuerpo de la superficie celular que se une al antígeno nativo, como el receptor de célula B (BCR). Los linfocitos T no forman anticuerpos, pero poseen también un receptor para el antígeno en la superficie celular, el receptor de célula T (TCR). Aunque por simplicidad se muestra el TCR reconociendo directamente el antígeno (al igual que el BCR de las células B), en la mayoría de los casos el TCR tiene un sistema de reconocimiento algo más complicado en el que necesita ver fragmentos de antígeno procesado presentados a él por moléculas del CMH (véanse Figuras 2.15 y 2.16). Tras su activación por el antígeno, las células B pueden evolucionar a plasmocitos secretores de anticuerpo o en células B de memoria. Por el contrario, las células producidas tras la activación de linfocitos T serán células T *helper*, células T efectoras citotóxicas o reguladoras, junto con células T de memoria.

Avances y descubrimientos 2.1.— Teoría de la selección clonal

Producción de anticuerpos según Ehrlich

En 1894, como de costumbre muy adelantado a su tiempo, el destacado Paul Ehrlich propuso la teoría de la cadena lateral de producción de anticuerpos. Cada célula elaboraría una gran variedad de receptores de superficie que fijarían antígenos extraños de acuerdo con un mecanismo de encaje por formas complementarias de tipo "llave y cerradura". La exposición al antígeno provocaría la superproducción de receptores (anticuerpos) que luego se liberarían a la circulación (Figura A2.1.1).

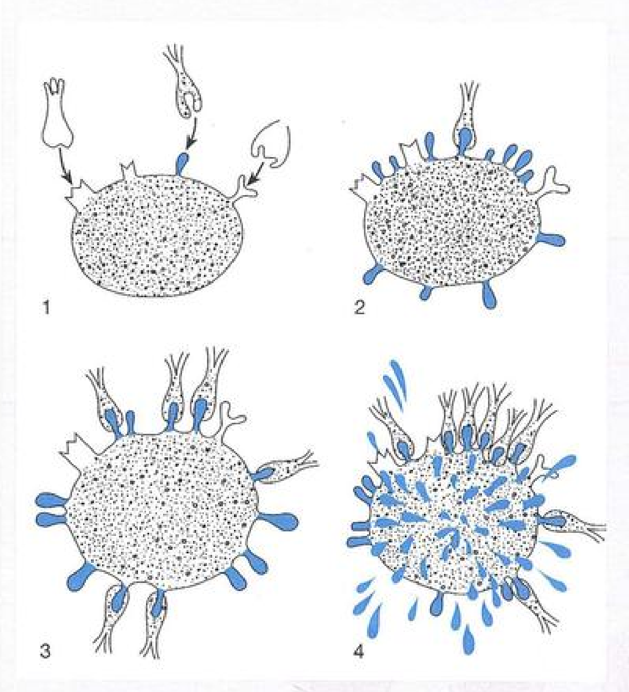


Figura A2.1.1. Teoría de la cadena lateral de Ehrlich de la producción de anticuerpos. (Reproducido de Proceedings of the Royal Society B [1900], **66**, 424).

Teorías de las matrices

La hipótesis de Ehrlich implicaba que los anticuerpos se preformaban antes de la exposición al antígeno. Sin embargo, este concepto era difícil de aceptar cuando estudios posteriores demostraron que los anticuerpos se podían formar casi contra cualquier estructura orgánica sintetizada en el laboratorio químico (p. ej., arsonato de azobenceno; Figura 5.6), a pesar de que estas moléculas nunca se encuentran en el medio natural. Se concibió de tal modo la idea de que los anticuerpos se sintetizan utilizando el antígeno como matriz. Pasaron 20 años antes de que se descartara este concepto cuando se observó que la molécula de anticuerpo que se desplegaba con sales de guanidinio en ausencia de antígeno se volvía a plegar de manera espontánea para regenerar su especificidad original. Se descubrió que cada anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos diferente, que determina su forma plegada final y, en consecuencia, su capacidad para reconocer el antígeno.

Teorías de la selección

La rueda completa su giro y una vez más se acepta que como los distintos anticuerpos deben ser codificados por genes separados, la información para elaborarlos debe preexistir en el DNA del huésped. En 1955, Nils Jerne percibió que esto podría sentar la base de una teoría selectiva para la producción de anticuerpos. Sugirió que la totalidad del repertorio de anticuerpos se expresa en bajo grado y que cuando el antígeno ingresa en el organismo selecciona el anticuerpo complementario para formar un complejo que de alguna manera induce la síntesis adicional de ese anticuerpo en particular. No obstante, faltaba descubrir la forma en que lo llevaba a cabo.

Entonces Macfarlane Burnett concibió la brillante idea de asignar a una base celular este proceso de selección; que cada linfocito fuera programado para elaborar su propio anticuerpo exclusivo, y que éste se insertara en su membrana superficial como la cadena lateral de Ehrlich. El antígeno formaría luego el complejo propuesto por Jerne sobre la superficie del linfocito y, al desencadenar su activación y proliferación clonal, se sintetizarían grandes cantidades del anticuerpo específico (Figura 2.12). Ehrlich merece nuestro respeto por su visión dado que estuvo muy cerca ya en 1894.

Memoria inmunitaria adquirida

Por definición, cuando se elabora una respuesta de anticuerpos contra un agente infeccioso dado, ese microorganismo debe estar presente en nuestro entorno y es probable que volvamos a encontrarnos con él. Entonces tendría sentido que los mecanismos inmunitarios alertados por el primer contacto con el antígeno contaran con algún sistema de memoria que permitiera que las respuestas a cualquier exposición posterior fueran más rápidas y de mayor intensidad.

Nuestra experiencia con muchas infecciones comunes indica que debe ser así. Rara vez se presentan dos veces enfermedades como sarampión, parotiditis, varicela y tos ferina, entre otras. Es obvio que el primer contacto imparte cierta información, cierta **memoria**, por lo cual el cuerpo se prepara con eficacia para repeler cualquier invasión posterior por ese microorganismo y se establece un estado de inmunidad.

Las respuestas secundarias de anticuerpos son mejores

Si se sigue la producción de anticuerpos ante el primer y el segundo contactos con el antígeno se descubre la base del desarrollo de la inmunidad. Por ejemplo, cuando en un conejo se inyecta un producto bacteriano, como toxoide tetánico en conejos, por las razones ya explicadas pasan varios días antes de poder detectar anticuerpos en la sangre, que alcanzan un nivel máximo y luego descienden (Figura 2.13). Si entonces se permite que el animal descanse y más tarde se le inyecta una segunda dosis de toxoide, el curso de los procesos sufre un cambio notable. Al cabo de 2 a 3 días, el nivel de anticuerpos en la sangre asciende en forma abrupta hasta alcanzar valores muy superiores a los observados en la **respuesta inmunitaria primaria**. Esta **respuesta inmunitaria secundaria** se caracteriza por presentar una producción más rápida y abundante de anticuerpos como

Células B		Células T		
a) Antígeno		Fragmento del antígeno (péptido) + CMH		Activación selectiva del linfocito
b)				Proliferación clonal
c) Pc / Ac		Células Th, Tc o Tr		Diferenciación
Células efectoras que producen la respuesta inmunitaria	Células de memoria	Células efectoras que producen la respuesta inmunitaria	Células de memoria	

Figura 2.12. Base celular de la generación de células efectoras y de memoria por selección clonal después del contacto primario con el antígeno.

a) El linfocito (célula B o célula T) es seleccionado por el antígeno y se activa. b) Entonces sufre repetidas divisiones celulares (proliferación clonal) y la progenie da origen a una población expandida de células específicas para el antígeno. c) Una fracción de la progenie de los linfocitos originales reactivos del antígeno se convierten en células de memoria mientras que otras se diferencian en células efectoras. En el caso de los linfocitos B, las células efectoras son los plasmocitos secretores de anticuerpos, mientras que en el caso de los linfocitos T, las células efectoras pueden ser células T *helper* (Th), células T citotóxicas (Tc) o células T reguladoras (Tr).

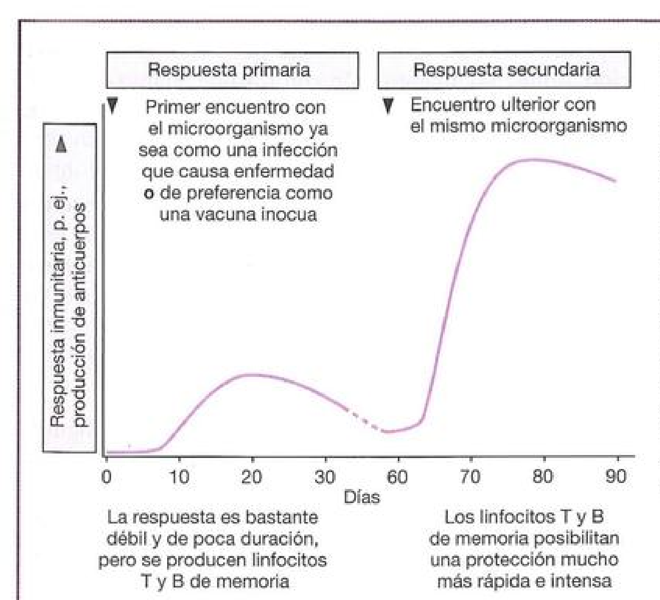


Figura 2.13. Respuestas primaria y secundaria.

El primer encuentro con un antígeno, por ejemplo sobre un microorganismo patógeno, induce una respuesta inmunitaria primaria que es más bien lenta en su evolución porque lleva tiempo para que los linfocitos vírgenes se expandan en cantidades suficientes. La respuesta no es de gran magnitud y se desvanece con relativa rapidez. La respuesta en el segundo contacto con el mismo antígeno es mucho más rápida e intensa. Las células de memoria generadas durante la respuesta primaria son superiores cuantitativa y cualitativamente a los linfocitos vírgenes, que requieren menos ciclos de división celular antes de que evolucionen a células efectoras. La generación de células de memoria proporciona las bases de la vacunación, en la que la respuesta inmunitaria es programada por una forma relativamente inocua del antígeno microbiano de modo que el sistema inmunitario forma una respuesta inmunitaria secundaria tras el primer encuentro con el patógeno real.

Figura 2.14. La memoria de una respuesta primaria puede ser transferida por los linfocitos pequeños.

Los receptores se tratan con una dosis de rayos X que destruye directamente los linfocitos (muy sensibles a las radiaciones), pero sólo afecta a las demás células del organismo durante su división; de esta manera, el receptor permite seguir la actividad de las células del donante. En el texto se presentan las bases de diseño del experimento.

	Primera inyección de antígeno	Transferencia de linfocitos pequeños al receptor irradiado	Refuerzo con el antígeno	Determinación de la respuesta de anticuerpos contra:	
				Toxoide tetánico	Hemaglutinina de influenza
a	Toxoide tetánico		Toxoide tetánico	Secundaria	–
b	Toxoide tetánico		Hemaglutinina de influenza	Primaria	Primaria
c	Hemaglutinina de influenza		Toxoide tetánico	Primaria	Primaria
d	Hemaglutinina de influenza		Hemaglutinina de influenza	–	Secundaria

consecuencia de la "puesta a punto" o la estimulación del sistema formador de anticuerpos.

El hecho de que los linfocitos son las células que proporcionan la memoria inmunitaria queda demostrado mediante la **transferencia adoptiva** de linfocitos a otro animal, sistema de experimentación que se utiliza a menudo en inmunología (véase Figura 2.9). En este caso, el potencial inmunitario de las células transferidas se expresa en un receptor tratado con rayos X para destruir su propia población linfocítica; por lo tanto, el animal receptor actúa como un "tubo de ensayo" viviente en el que la actividad de los linfocitos transferidos puede evaluarse *in vivo*. Si se toman linfocitos pequeños de un animal que había recibido una inyección inicial de antígeno (p. ej., toxoide tetánico o hemaglutinina del virus influenza) y se transfieren a un huésped irradiado que luego se expone al mismo antígeno, se observa una rápida e intensa producción de anticuerpos, característica de la respuesta secundaria (Figura 2.14a, d). Para descartar la posibilidad de que la primera inyección del antígeno pudiera ejercer un efecto estimulador inespecífico sobre los linfocitos, se estimuló a un grupo control "cruzado" de animales por inyección con un antígeno diferente que el administrado en la inyección original. En estos animales de control sólo se observan las respuestas primarias para cada antígeno (Figura 2.14b, c). Ya se explicó el diseño del experimento con cierto detalle para alertar acerca de la necesidad de la selección cuidadosa de controles.

La mayor respuesta obtenida por una población de linfocitos sensibilizados se puede atribuir sobre todo a la expansión de la cantidad de células capaces de ser estimuladas por el antígeno (Figura 2.12), si bien más adelante se verá que también en estas células de memoria existen ciertas diferencias cualitativas (pp. 254-8).

La inmunidad adquirida tiene especificidad por el antígeno

Distinción entre diferentes antígenos

La adquisición de memoria o inmunidad contra un microorganismo no confiere protección contra otro no relacionado con el primero. Tras una infección por sarampión se produce inmunidad contra infecciones ulteriores, pero se mantiene la susceptibilidad a otros agentes, como los virus de la varicela o de la parotiditis. Por lo tanto, la inmunidad adquirida muestra **especificidad**, y el sistema inmunitario puede diferenciar de manera específica entre los dos microorganismos. En la Figura 2.14 se presenta una demostración experimental más formal de este potencial de diferenciación, donde la programación con toxoide tetánico evocó la memoria para ese antígeno y no para el virus de influenza (gripe), y viceversa.

La base de este fenómeno reside en la capacidad de los sitios de reconocimiento de las moléculas de anticuerpos para distinguir entre los antígenos; los anticuerpos que reaccionan con el toxoide no se unen al virus de la gripe y, *mutatis mutandi*, como se dice, los anticuerpos antigripales no reconocen el toxoide.

Distinción entre lo propio y lo no propio

Esta capacidad para reconocer un antígeno y distinguirlo de otro llega aún más allá. El individuo también debe reconocer lo que es extraño, es decir, "no propio". La incapacidad de diferenciar entre lo **propio** y lo **no propio** podría inducir la síntesis de anticuerpos dirigidos contra componentes del propio cuerpo del individuo (**autoanticuerpos**), lo cual en principio generaría grandes inconvenientes. Sobre bases puramente teóricas, Burnet y Fenner pensaron

que el cuerpo debía desarrollar algún mecanismo para distinguir entre lo "propio" y lo "no propio", y propusieron que de alguna manera podría "aprender a reconocer" como propios los componentes circulantes del cuerpo capaces de llegar hasta el sistema linfoide en desarrollo en el período perinatal. Entonces se crearía una falta de respuesta permanente o **tolerancia**, de modo que cuando se alcanza la madurez inmunitaria, en condiciones normales habría una incapacidad para responder contra los componentes "propios". En esta etapa cabe destacar que Burnet tuvo la sagacidad de comprender que esta teoría de la selección clonal podía proporcionar con facilidad una base celular para efectuar ese mecanismo. Este autor sostenía que si tras la selección clonal, cada población de linfocitos se ocupaba de elaborar su propio anticuerpo específico individual, las células programadas para expresar anticuerpos capaces de reaccionar con los componentes propios circulantes podían transformarse en inoperantes sin afectar los linfocitos específicos contra agentes extraños. En otras palabras, era posible suprimir o transformar en tolerantes los linfocitos que reaccionaban contra lo propio sin afectar la capacidad del huésped para generar una respuesta inmunitaria contra los agentes infecciosos. Como se verá en el Capítulo 11, estas predicciones han sido ampliamente confirmadas, si bien se observará que a medida que se diferencian linfocitos nuevos en el curso de la vida, todos deben atravesar el proceso de control de tolerancia hacia lo propio. No obstante, la tolerancia por lo propio no es absoluta y en condiciones normales es inocua, si bien en todos los seres humanos existen linfocitos contra lo propio potencialmente perjudiciales.

La vacunación depende de la memoria adquirida

Hace unos 200 años, Edward Jenner llevó a cabo los estudios notables que marcaron el comienzo de la inmunología como disciplina sistemática. Observando la hermosa piel sin pústulas de las vacas lecheras razonó que la exposición deliberada al virus de la viruela vacuna, no virulenta para los seres humanos, podría conferir protección contra el microorganismo relacionado de la viruela humana. Así, inoculó a un niño pequeño con el virus vacuno y observó con satisfacción (y un suspiro de alivio) que quedaba protegido contra una exposición posterior al virus de la viruela (cabe preguntarse qué habrían opinado las comisiones de ética actuales). Con la inyección de una forma inocua de un microorganismo patógeno, Jenner había utilizado la especificidad y la memoria de la respuesta inmunitaria adquirida para establecer las bases de la **vacunación** moderna (lat. *vacca*, vaca).

La estrategia esencial es preparar una forma *inocua* del microorganismo infeccioso o sus toxinas que aún retengan de manera sustancial los antígenos capaces de establecer la inmunidad protectora (Figura 2.13), lo cual se consiguió mediante el uso de microorganismos muertos o vivos atenuados, componentes microbianos purificados o antígenos modificados por medios químicos

La inmunidad celular protege contra microorganismos intracelulares

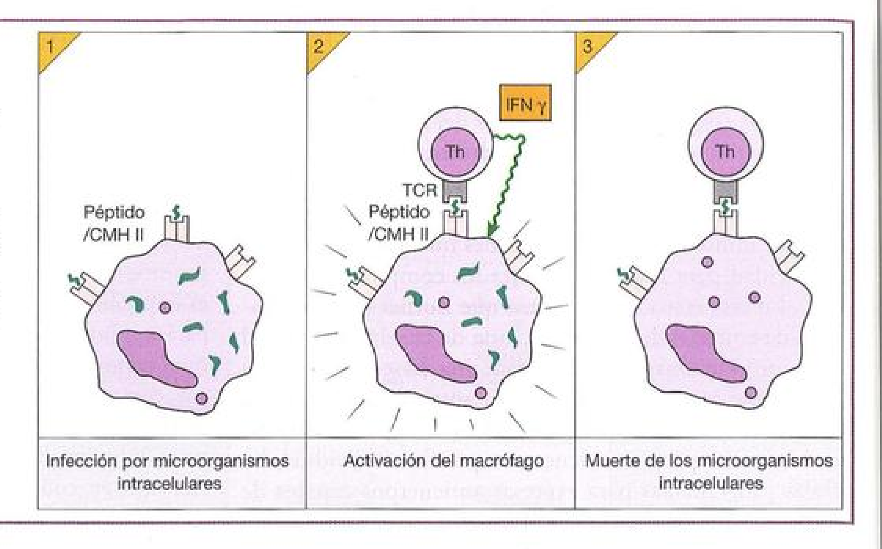


El término **inmunidad mediada por células** se utiliza para describir las respuestas de **células** T, en particular con respecto a la capacidad de algunos tipos de células T para activar macrófagos y la capacidad de los linfocitos T citotóxicos para destruir directamente las células infectadas. Muchos microorganismos viven en el interior de las células del huésped, donde es imposible que los alcancen los anticuerpos humorales. Los parásitos intracelulares obligados, como los virus, deben replicarse dentro de las células; los parásitos intracelulares facultativos, como *Mycobacterium* y *Leishmania*, pueden multiplicarse en el interior de las células, en particular los macrófagos, pero no es indispensable; prefieren la vida intracelular por la protección que les confiere. Las células T están especializadas para actuar contra células que portan microorganismos intracelulares. Sus **receptores de células T** (TCR) para el antígeno, que son diferentes de las moléculas de anticuerpos utilizadas por los linfocitos B, no reconocen directamente el antígeno intacto. En cambio, este receptor reconoce el antígeno que primero es **procesado** por la célula en la cual se localiza y con posterioridad es **presentado** a la célula T. Este mecanismo más intrincado necesario para el reconocimiento del antígeno es necesario para que la célula T vea al antígeno en asociación con una célula, en lugar de antígenos no asociados con la célula, como sucede con las bacterias extracelulares que pueden ser atacadas por los anticuerpos. Los antígenos proteicos dentro de las células son digeridos por proteasas intracelulares para generar **péptidos** cortos. A continuación, estos péptidos deben trasladarse a la superficie de la célula a fin de que sean reconocidos por el TCR de las células T. Si no están acompañados, es poco probable que los péptidos permanezcan en la superficie celular. Sin una secuencia transmembrana, ellos simplemente resbalarían por la superficie celular y quedarían a la deriva (lo que no es útil si las células T tienen que identificar la célula particular que está infectada). Un grupo importante de moléculas conocidas como **complejo mayor de histocompatibilidad (CMH)**, en principio identificadas por su capacidad para generar reacciones poderosas contra trasplantes entre miembros de la misma especie, lleva a cabo la función de transportar los péptidos a la superficie celular y luego los muestran a los TCR de las células T. Así, casi todas las células T reconocen el complejo **péptido + CMH** en lugar del antígeno nativo reconocido por las células B.

En general, las células T citotóxicas reconocen péptidos presentados por las moléculas de **clase I del CMH** que están presentes en casi todas las células nucleadas del cuerpo. Por el contrario, las células T *helper* y reguladoras suelen reconocer péptidos presentados por las moléculas de **clase II del CMH** que están, además de las moléculas de clase I del CMH, presentes en las denominadas "células presentadoras de antígeno profesionales": la célula dendrítica interdigitada, el macrófago y el linfocito B. Ahora las células T vírgenes (*naive*), es decir aquellas que no han tenido un encuentro anterior con su antígeno, deben ser presentadas al antígeno peptídico y al CMH mediante las células dendríticas interdigitadas (Figuras 2-7f y 7.16) antes de que puedan iniciarse en las rutinas de una respuesta primaria. Sin embargo, una vez programadas, pueden

Figura 2.15. Muerte intracelular de microorganismos por los macrófagos.

1) Un péptido antigénico ( ) derivado de los microorganismos intracelulares forma complejos con las moléculas de clase II del CMH de la superficie celular ( ). 2) La célula T sensibilizada se une a este complejo péptido-CMH mediante el receptor de célula T (TCR) y es activada para liberar la citocina interferón γ (IFNγ). Este proceso activa los mecanismos microbicidas en el macrófago. (3) El agente infeccioso encuentra una muerte oportuna.



ser activadas por el antígeno peptídico y el CMH que se encuentran en la superficie de los macrófagos (o células B), como se verá a continuación.

Las células T productoras de citocinas contribuyen a que los macrófagos destruyan parásitos intracelulares

Estos microorganismos pueden sobrevivir dentro de los macrófagos gracias a su capacidad de alterar los mecanismos destructores innatos de los fagocitos. No obstante, no pueden impedir que el macrófago procese pequeños fragmentos antigénicos (provenientes tal vez de microorganismos que murieron espontáneamente) y los coloque sobre la superficie de la célula huésped. Si son inducidos con ese antígeno, una subpoblación de linfocitos T, denominada **células T helper,** lo reconocerá y se unirá a la combinación del antígeno con las moléculas de **clase II** del CMH situadas sobre la superficie del macrófago, y producirá varios factores solubles denominados **citocinas,** por ejemplo las interleucinas IL-2 y otras (p. 229). Diferentes tipos celulares pueden elaborar distintas citocinas, y por lo general actúan a corta distancia sobre células vecinas. Algunas citocinas de células T ayudan a las células B a elaborar anticuerpos, mientras que otras, como el interferón γ (IFNγ), actúan como **factores activadores de macrófagos** que restablecen los mecanismos antimicrobianos del macrófago alterados antes, y llevan a cabo la muerte de microorganismos intracelulares (Figura 2-15).

Las células infectadas por virus pueden ser eliminadas por las células T citotóxicas y la CCDA

Ya se analizó la ventaja que representa para el huésped la destrucción de células infectadas por virus antes de que éstos comiencen a replicarse, y que las células NK (p. 26) pueden llevar a cabo una función citotóxica por medio de sus receptores activadores de NK (Figura 2.16a y Cuadro 4.3). Estos receptores tienen inherentemente un espectro limitado de especificidades. Sin embargo, las células NK también poseen receptores para la porción constante (Fc) de la molécula de anticuerpo (como se describió antes respecto de las células fagocíticas, p. 37). Esta situación permite que se expanda enormemente el espectro de sus objetivos potenciales porque los receptores Fc pueden reconocer el anticuerpo específico del virus que recubre la célula diana si algún antígeno viral intacto está presente en la superficie de la célula infectada. En consecuencia, los anticuerpos acercarán la célula NK a la célula

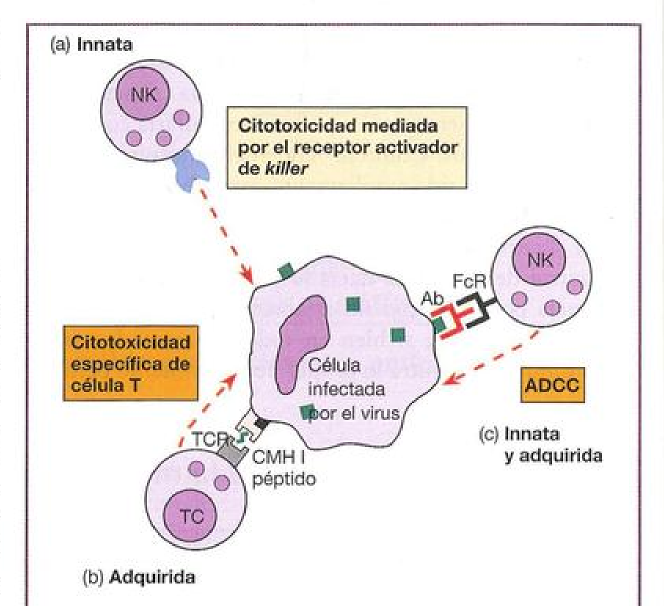


Figura 2.16. Muerte de células infectadas por virus.

a) La destrucción de células infectadas por las células *natural killer* (NK) de la respuesta innata puede ser secundaria a su reconocimiento por los receptores activadores de la muerte. b) Las células T citotóxicas de la respuesta adquirida reconocen de manera específica la célula diana infectada a través del reconocimiento de los TCR de los péptidos provenientes de los virus presentados por las moléculas de clase I del CMH. c) Además del reconocimiento directo por sus receptores activadores de la muerte, las células NK poseen receptores Fc y, por consiguiente, pueden reconocer los anticuerpos que están unidos a los antígenos virales intactos presentes sobre la superficie de las células infectadas. Por lo tanto, esto es un ejemplo de las respuestas innata y adquirida que actúan juntas para derrotar al enemigo y, en este caso, se denomina citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA).

diana por la formación de un puente, y la célula NK activada por las moléculas de anticuerpo en el complejo podrá destruir la célula infectada por el virus mediante sus mecanismos extracelulares (Figura 2.16c). Este sistema se denomina **citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA).**

Por otra parte, también existe una subpoblación de **células T con potencial citotóxico.** Al igual que las células T *helper*, estas células tienen un amplio espectro de especificidad antigénica debido a que expresan de manera clonal un número grande de distintos receptores de superficie similares, pero no idénticos, a los receptores de anticuerpo de superficie sobre los linfocitos B. También en este caso cada linfocito está programado para formar un solo receptor, y al igual que la célula T *helper*, reconoce fragmentos de antígenos proteicos (péptidos) asociados con un marcador celular, en este caso la molécula de **clase I** del CMH (Figura 2.16b). Por medio de este reconocimiento del antígeno de superficie, la célula citotóxica entra en contacto íntimo con su célula diana y le administra el "beso de la muerte por apoptosis". También libera **IFNγ**, que contribuye a limitar la diseminación del virus a las células adyacentes, sobre todo en los casos en que el virus en sí puede ser un inductor débil de IFNα o β.

De un modo totalmente análogo a la célula B, las células T son seleccionadas y activadas por la combinación con el antígeno, se expanden por proliferación clonal y maduran para generar células T *helper* y células T citotóxicas efectoras o células T reguladoras, además de una mayor población de células de memoria (Figura 2.12).

En consecuencia, las células T y B proporcionan **inmunidad adquirida específica** mediante diversos mecanismos, que en la mayoría de los casos operan para ampliar el espectro de eficacia de la inmunidad innata y confieren la ventaja valiosa de prepararnos frente a la primera infección para resistir contactos posteriores con el mismo microorganismo. La característica definitoria de la respuesta adquirida es que está mediada por **linfocitos** que, al contrario de las células que intervienen en la respuesta innata, son altamente **específicas para el antígeno** y muestran **memoria** inmunitaria. Sin embargo, cabe señalar dos puntos importantes en este momento. En primer lugar, las respuestas innata y adquirida normalmente actúan en conjunto para derrotar el patógeno y, en segundo lugar, que estos dos sistemas se combinan entre sí con algunos tipos de células con características que relacionan ambos tipos de respuesta.

Inmunopatología

No cabe duda de que el sistema inmunitario es "algo bueno", pero al igual que los ejércitos mercenarios, puede volverse y morder la mano que lo alimenta y causar daño al huésped (Figura 2.17).

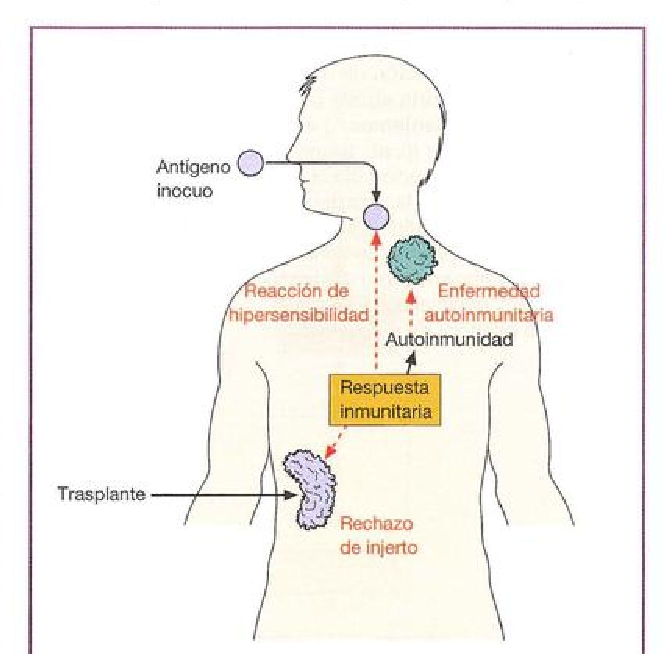


Figura 2.17. Las respuestas inmunitarias inadecuadas pueden producir reacciones con daño como la respuesta de hipersensibilidad contra antígenos (alérgenos) inhalados (inocuos de otro modo), la destrucción del tejido propio por ataque autoinmunitario y el rechazo de tejidos trasplantados.

Por lo tanto, cuando se observa una respuesta especialmente intensa o hay una exposición persistente a antígenos exógenos se puede presentar daño tisular o producirse **reacciones de hipersensibilidad**. Son ejemplos la alergia al polen de las gramíneas, la glomerulonefritis por inmunocomplejos que aparecen tras la infección por estreptococos y los granulomas crónicos en el curso de la tuberculosis o la esquistosomiasis.

En otros casos se puede originar hipersensibilidad a autoantígenos por alteraciones de los mecanismos que controlan la tolerancia hacia lo propio, y son ahora bien conocidas muchas **enfermedades autoinmunitarias**, como la diabetes de tipo I (insulinodependiente), la esclerosis múltiple y muchos de los trastornos reumáticos conocidos.

Otra reacción inmunopatológica con consecuencias importantes es el **rechazo de trasplantes**, en el que los antígenos CMH del injerto del donante bien pueden provocar una reacción intensa.

RESUMEN

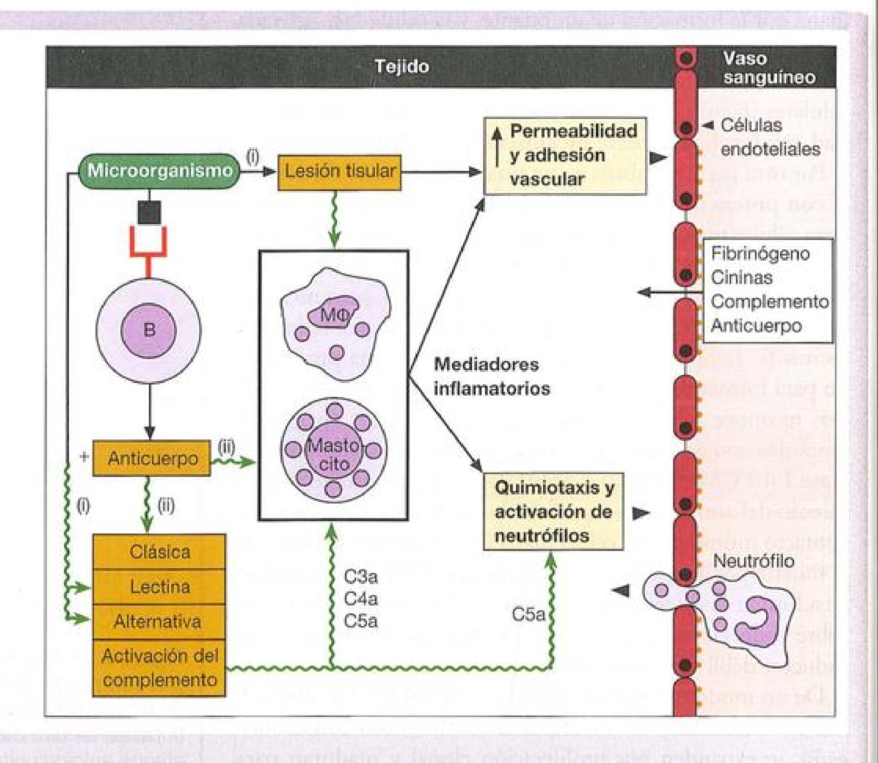
Antígeno

- Los antígenos reconocidos por el sistema inmunitario pueden ser proteínas, hidratos de carbono, lípidos o muchos otros tipos de moléculas.
- Ellos tienen una conformación que es complementaria a la de los receptores del antígeno situados sobre las células del sistema inmunitario y para las moléculas de anticuerpos secretados.
- Los componentes de agentes extraños y también nuestros propios componentes del cuerpo pueden actuar como antígenos.

Los anticuerpos, las moléculas específicas de reconocimiento del antígeno

- Las moléculas de anticuerpos evolucionaron para unirse a los microorganismos y se centran en otros componentes de la respuesta inmunitaria del agente infeccioso.
- El anticuerpo se une al antígeno por medio de su sitio de reconocimiento específico, y sus regiones de estructura constante activan el complemento a través de la vía clásica (por unión de C1 y la generación de una C4b2a convertasa para escindir C3) y de los fagocitos mediante sus receptores Fc.

Figura 2.18. Producción de una reacción inflamatoria aguda protectora por microorganismos: i) a través de lesión tisular (p. ej., toxina bacteriana) o de la activación directa de las vías alternativa o lectina del complemento, o ii) por estimulación dependiente del anticuerpo de la vía clásica del complemento o desgranulación de los mastocitos (a cargo de una clase especial de anticuerpo, IgE).



- Esta vía complementaria hacia la reacción inflamatoria aguda es estimulada por los anticuerpos IgE, que sensibilizan los mastocitos, y por inmunocomplejos, que estimulan la liberación de mediadores por los macrófagos tisulares (Figura 2.18).
- La reacción inmunitaria innata de la lectina de unión a manosa con los microorganismos activa las proteasas MASP-1 y MASP-2, las cuales se unen a la vía clásica del complemento mediante la escisión de C4 y C2.

Base celular de la producción de anticuerpos

- Los anticuerpos son secretados por los plasmocitos que derivan de los linfocitos B, cada una de las cuales está programado para elaborar un anticuerpo de especificidad única localizado en la superficie celular como receptor para el antígeno.
- El antígeno se une a la célula B que tiene el anticuerpo complementario, la activa, causa la proliferación clonal y, por último, favorece su diferenciación en plasmocitos secretores del anticuerpo y células de memoria. De tal manera, el antígeno induce la selección clonal de las células que elaboran el anticuerpo contra el antígeno particular.

Memoria adquirida y vacunación

- El incremento de las células de memoria tras la sensibilización implica que la respuesta secundaria adquirida es más rápida e intensa, y proporciona la base de la vacunación mediante el empleo de una forma inocua del agente infeccioso para el encuentro inicial.

La inmunidad adquirida tiene especificidad antigénica

- Los anticuerpos diferencian a los antígenos porque el reconocimiento se basa en la complementariedad de la forma molecular. Así, la memoria inducida por un antígeno no se extiende a otro antígeno no relacionado.
- El sistema inmunitario diferencia los componentes propios de los antígenos extraños al transformar en inactivos los linfocitos inmaduros que reaccionan con lo propio a través del contacto con las moléculas del huésped; los linfocitos que reaccionan con los antígenos extraños no son afectados (la infección es en general un evento pasajero), porque sólo entran en contacto después de alcanzar la madurez.

La inmunidad celular protege contra microorganismos intracelulares

- Otra clase de linfocitos, las células T, se encargan del control de las infecciones intracelulares. Al igual que las células B, cada célula T tiene su receptor de antígeno individual (el TCR, que difiere en cuanto a la estructura del anticuerpo) que reconoce el antígeno, y luego la célula sufre expansión clonal para formar células efectoras y de memoria que proporcionan la inmunidad adquirida específica.
- La célula T reconoce los antígenos procesados asociados con las moléculas del CMH. Las células T vírgenes sólo son estimuladas para generar una respuesta primaria por células dendríticas especializadas presentadoras de antígeno.
- Las células T *helper* sensibilizadas, que detectan el antígeno como péptidos con la molécula de clase II del CMH en la superficie de las células presentadoras de antígeno profesionales (células dendríticas, macrófagos y linfocitos B), liberan citocinas que en algunos casos pueden contribuir a que las células B elaboren el anticuerpo y que en otros activen los macrófagos y les permitan destruir parásitos intracelulares.
- Las células T citotóxicas tienen la capacidad de reconocer péptidos antigénicos específicos más moléculas de clase I del CMH en la superficie de las células infectadas por virus. Entonces, estas células infectadas son destruidas para evitar la replicación del virus. Las células T también liberan interferón γ que torna resistentes las células vecinas a la diseminación viral (Figura 2.19).

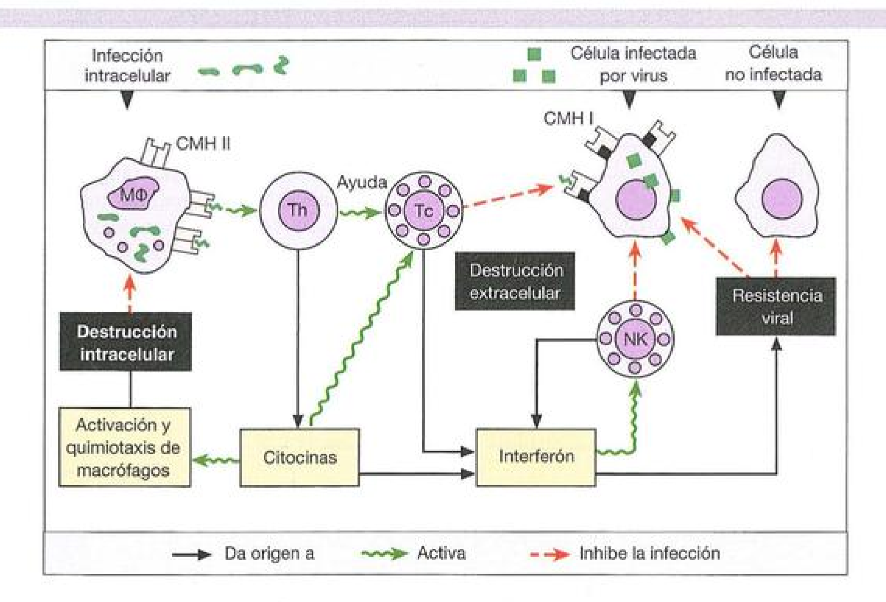


Figura 2.19. Las células T se unen con el sistema inmunitario innato para resistir la infección intracelular.

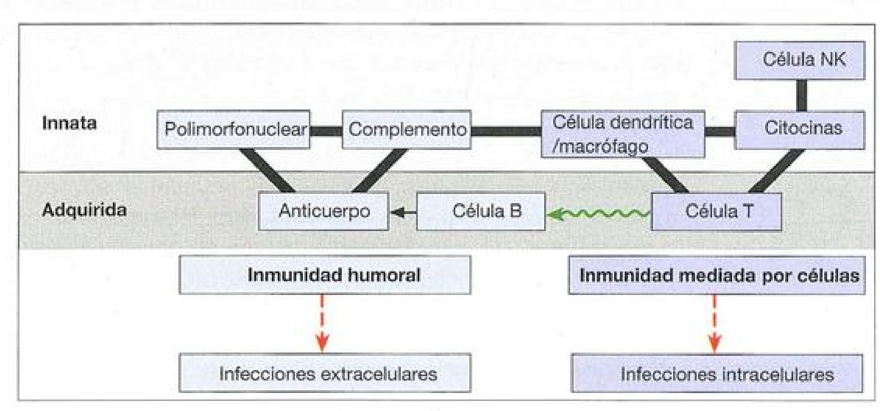
Las moléculas de clase I y de clase II del CMH son importantes para el reconocimiento del antígeno de superficie por las células T. Las células T *helper* (Th) colaboran en el desarrollo de las células T citotóxicas (Tc) a partir de precursores. Los mecanismos microbicidas de los macrófagos (Mϕ) son activados por las linfocinas activadoras de macrófagos. El interferón inhibe la replicación viral y estimula las células NK que, junto con las Tc, destruyen las células infectadas por virus.

- Las células NK de la respuesta pueden actuar junto con los anticuerpos de la respuesta adquirida mediante el reconocimiento de las células infectadas por virus recubiertas por anticuerpos a través de los receptores Fcγ. Entonces, ellas destruyen la célula diana por CCDA.
- Si bien los mecanismos innatos no mejoran con la exposición repetida a la infección, como sucede con la inmunidad adquirida, desempeñan una función vital debido a que están íntimamente relacionados con los sistemas adquiridos por **dos vías diferentes** que casi **engloban la totalidad de la inmunología**. El anticuerpo, el complemento y los polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos) confieren protección contra la mayoría de los microorganismos extracelulares, mientras que las células T, las citocinas solubles, las células dendríticas, los macrófagos y las células NK intervienen en las infecciones intracelulares (Figura 2.20).

Inmunopatología

- La lesión tisular del huésped mediada por procesos inmunopatológicos puede producirse como consecuencia de:
- reacciones inadecuadas de hipersensibilidad contra antígenos exógenos;
- pérdida de la tolerancia a lo propio que da origen a enfermedades autoinmunitarias;
- reacciones a injertos extraños.

Figura 2.20. Las dos vías que relacionan la inmunidad innata con la adquirida, y proporcionan las bases para la inmunidad humoral y celular, respectivamente.



LECTURAS ADICIONALES

Berke G. & Clark W.R. (2007) Killer lymphocytes. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 369 pp.

Borghesi L. & Milcarek C. (2007) Innate versus adaptive immunity: a paradigm past its prime? Cancer Research 67, 3989–3993.

Carroll M.C. (2008) Complement and humoral immunity. Vaccine 26 Suppl 8:128–33.

Cohn M., Mitchison N.A., Paul W.E., Silverstein A.M., Talmage D.W. & Weigert M. (2007) Reflections on the clonal-selection theory. Nature Reviews Immunology 7, 823–830.

Lee H.K. & Iwasaki A. (2007) Innate control of adaptive immunity: dendritic cells and beyond. Seminars in Immunology 19, 48–55.

Palm N.W. & Medzhitov R. (2009) Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. Immunological Reviews 227, 221–233.

Ricklin D., Hajishengallis G., Yang K. & Lambris J.D. (2010) Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. Nature Immunology 11, 785–797.

Silverstein A.M. (2009) A History of Immunology. 2nd ed. Academic Press, San Diego.

Sjöberg A.P., Trouw L.A. & Blom A.M. (2009) Complement activation and inhibition: a delicate balance. Trends in Immunology 30, 83–90.



CAPÍTULO 3
Anticuerpos

Conceptos clave

A modo de resumen...

Para resistir la agresión de un sinnúmero de patógenos, hemos desarrollado mecanismos generales de defensa (inmunidad innata) y mecanismos específicos para un determinado patógeno (inmunidad específica adquirida o adaptativa). Este último mecanismo, como su nombre lo indica, puede ser adquirido y optimizado a través del contacto con el patógeno o por la vacunación. Los participantes fundamentales de la inmunidad específica son los anticuerpos y las células T. En este capítulo consideramos en detalle los anticuerpos.

Introducción

En esencia, las moléculas de anticuerpos llevan a cabo dos funciones principales en la defensa inmunitaria. La **primera función** es reconocer y unirse al material extraño (el antígeno). Esto significa la unión a estructuras moleculares en la superficie del material extraño (determinantes antigénicos) que difieren de las estructuras moleculares elaboradas por las células del huésped. Esos determinantes antigénicos suelen expresarse en copias múltiples sobre el material extraño, por ejemplo, proteínas o hidratos de carbono en la superficie de la célula bacteriana o en las espículas de la envoltura sobre la superficie de un virus. Los anticuerpos del huésped pueden reconocer una variedad grande de estructuras diferentes: el ser humano es capaz de producir anticuerpos contra miles de millones de estructuras moleculares distintas. Esto se describe como diversidad del anticuerpo y es necesario para responder a la enorme diversidad de estructuras moleculares asociadas con patógenos (a menudo con alto poder de mutación).

El simple acto de unión del anticuerpo puede ser suficiente para inactivar un patógeno o mantener inocua una toxina. Por ejemplo, el anticuerpo que recubre un virus puede impedir que éste ingrese en las células

Roitt's Essential Immunology, Twelfth Edition. Peter J. Delves, Seamus J. Martin, Dennis R. Burton, Ivan M. Roitt.

Introducción *(continuación)*

diana y "neutralizar", por consiguiente, el virus. Sin embargo, en muchos casos se despliega una **segunda función** de la molécula de anticuerpo para activar la eliminación del material extraño. En términos moleculares, esto implica la unión de ciertas moléculas (moléculas efectoras) al material extraño recubierto por anticuerpos para activar los mecanismos complejos de eliminación, por ejemplo, el sistema de proteínas del complemento o la fagocitosis por las células del sistema inmunitario del huésped, como neutrófilos y macrófagos, y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) por las células NK. Los poderosos sistemas efectores suelen ser activados sólo por moléculas de anticuerpos agrupadas sobre la superficie celular extraña y no por el anticuerpo libre no unido al ligando. Esto es crucial si se consideran las concentraciones típicamente elevadas de anticuerpos séricos.

División de las tareas

Los requerimientos impuestos en la molécula del anticuerpo por las dos funciones son, en cierto sentido, bastante opuestos. La primera función requiere gran diversidad del anticuerpo. La segunda función necesita que muchas moléculas diversas de anticuerpos compartan características comunes, es decir, no es práctico para la naturaleza crear una solución molecular diferente para el problema de eliminación de cada molécula distinta de anticuerpo. Los requerimientos contrapuestos son cumplidos con eficiencia por la estructura de anticuerpo mostrada en forma de diagrama en la Figura 3.1. La estructura consiste en 3 unidades. Dos de ellas son idénticas y están relacionadas con la unión al antígeno: los brazos **Fab (*fragment antigen binding;* fragmento de unión al antígeno)** de la molécula. Estas unidades contienen regiones de secuencia que varían mucho de un anticuerpo a otro y confieren en un anticuerpo dado su especificidad única de unión. La presencia de dos brazos Fab idénticos refuerza la unión del anticuerpo con el antígeno en la situación típica donde se presentan copias múltiples de determinantes antigénicos en el material extraño. La tercera unidad, **Fc (fragmento cristalizable)**, tiene a su cargo la unión con las moléculas efectoras. Como se observa en la Figura 3.1, la molécula de anticuerpo presenta una estructura de 4 cadenas que consiste en dos cadenas pesadas idénticas que comprenden los fragmentos Fab y Fc, y dos cadenas ligeras idénticas asociadas sólo con Fab. La relación entre la unión con el antígeno, las unidades diferentes y la estructura de 4 cadenas de la molécula de anticuerpo fue revelada por una serie de experimentos importantes resumidos en el recuadro de Avances y descubrimientos 3.1.

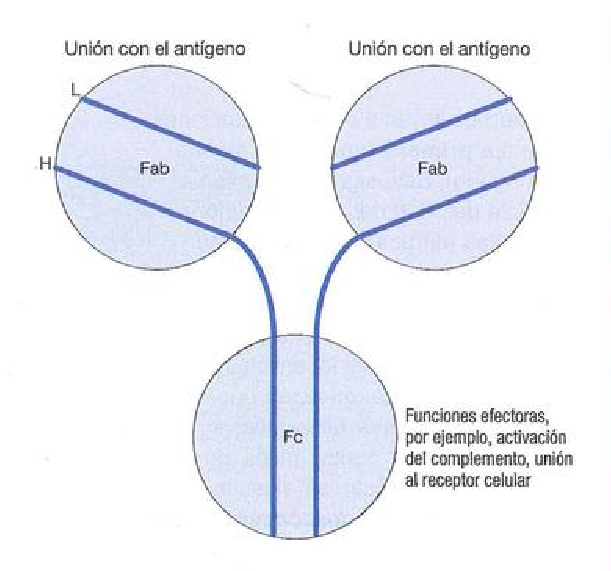


Figura 3.1. Disposición global simplificada de la molécula de anticuerpo.

La estructura consiste en cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) idénticas y dos cadenas ligeras (L) idénticas, dispuestas para abarcar tres unidades estructurales, como se muestra. Las dos unidades Fab idénticas se unen al antígeno, mientras que la tercera unidad (Fc) se une a las moléculas efectoras para activar la eliminación del antígeno y mediar funciones como el transporte maternofetal.

Cinco clases de inmunoglobulinas

Los anticuerpos a menudo se denominan **inmunoglobulinas** (proteínas inmunitarias). Hay 5 clases de anticuerpos o inmunoglobulinas conocidas como inmunoglobulina G (IgG), IgM, IgA, IgD e IgE. Todas estas clases tienen la estructura básica de anticuerpos con 4 cadenas, pero difieren en sus cadenas pesadas denominadas γ, μ, α, y δ, respectivamente. Las diferencias son más pronunciadas en las regiones Fc de las clases de anticuerpos y esto conduce a la activación de funciones efectoras diferentes en la unión con el antígeno, por ejemplo, el reconocimiento del antígeno por IgM podría llevar a la activación del complemento, mientras que el reconocimiento por IgE (posiblemente del mismo antígeno) podría producir la desgranulación de los mastocitos y la anafilaxia (aumento de la permeabilidad vascular y contracción del músculo liso). Estas diferencias se analizan con mayor detalle más adelante. Las diferencias estructurales también conducen a diferencias en el estado de polimerización de la unidad monomérica mostrada en la Figura 3.1. De tal modo, la IgG y la IgE suelen ser monoméricas, en tanto que la IgM aparece como un pentámero. La IgA se presenta de manera predominante como monómero en el suero y como dímero en las secreciones seromucosas. El principal anticuerpo sérico es la IgG, y como es el mejor estudiado en lo que respecta a su estructura y función, lo consideraremos primero. Las otras clases de anticuerpos serán comentadas en relación con la IgG.

Avances y descubrimientos 3.1—Estructura tetrapolipeptídica de los monómeros de inmunoglobulina

Los estudios iniciales demostraron que la mayor parte de la actividad de anticuerpo sérico aparecía en la fracción lenta de la corrida electroforética denominada γ globulina (con posterioridad, inmunoglobulina). Los anticuerpos más abundantes eran divalentes, es decir, presentaban dos sitios de combinación con el antígeno y, por lo tanto, podían formar un complejo precipitante (véase Figura 6.24).

Rodney Portey y Gerald Edelman merecen nuestro reconocimiento por haber desentrañado los secretos de la estructura básica de la molécula de inmunoglobulina. Si se reducen los enlaces disulfuro internos, las cadenas polipeptídicas aún permanecen unidas por atracciones no covalentes fuertes. Sin embargo, si la molécula reducida se mantiene en condiciones ácidas, esas fuerzas de atracción se pierden porque las cadenas quedan con carga positiva y entonces es posible separarlas mediante filtración en gel en cadenas más grandes, denominadas pesadas, de cerca de 55.000 Da (para IgG, IgA e IgD) o de 70.000 Da (para IgM e IgE), y en cadenas ligeras más pequeñas de casi 24.000 Da.

Las claves del modo en que las cadenas se ensamblan para formar la molécula de IgG provinieron de la escisión selectiva por medio de enzimas proteolíticas. La papaína destruye el poder precipitante de la molécula intacta, pero produce dos fragmentos Fab univalentes capaces de unirse al antígeno (Fab: del inglés *fragment antigen binding*); el fragmento restante no tiene afinidad por el antígeno y fue denominado Fc (fragmento cristalizable) por Porter. Tras la digestión con pepsina se aisló una molécula $F(ab')_2$, que era capaz de precipitar el antígeno y por lo tanto retiene ambos sitios de unión, mientras que la porción Fc se degradaba aún más. La base estructural de estas observaciones se aprecia con claridad en la figura A3.1.1. En esencia y con cambios menores, todas las moléculas de inmunoglobulina se constituyen a partir de una o más unidades monoméricas básicas de cuatro cadenas.

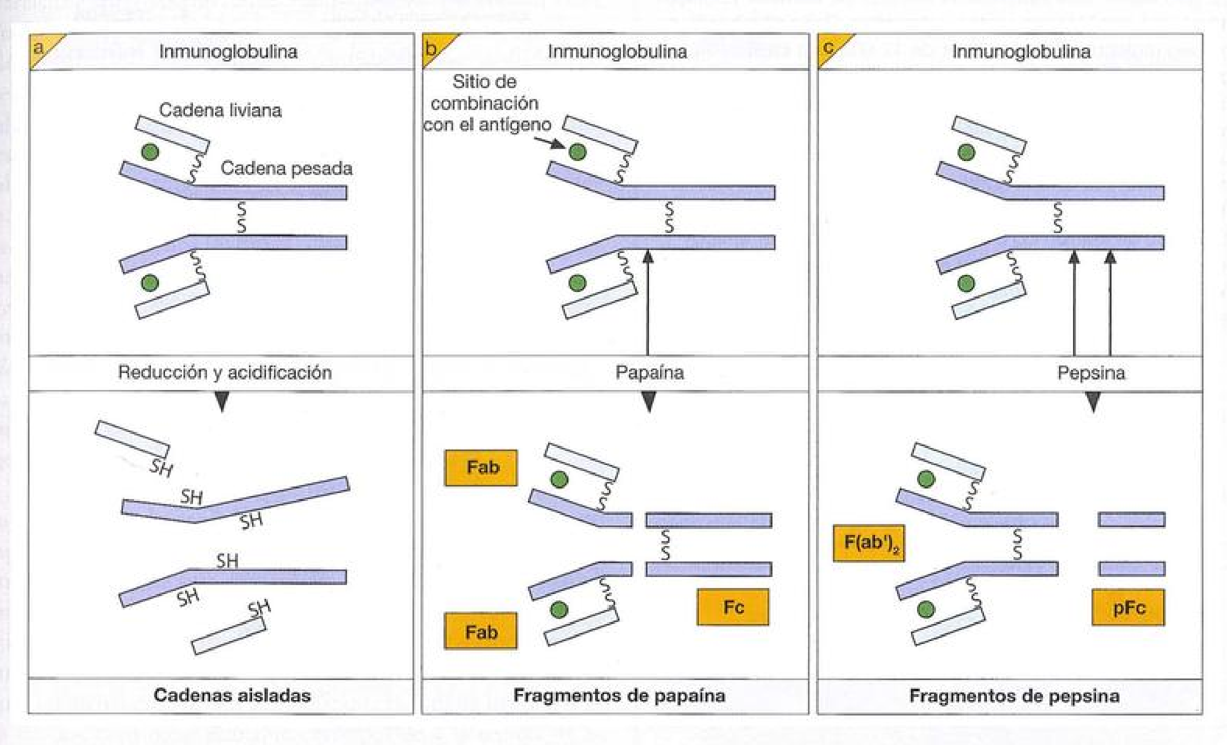


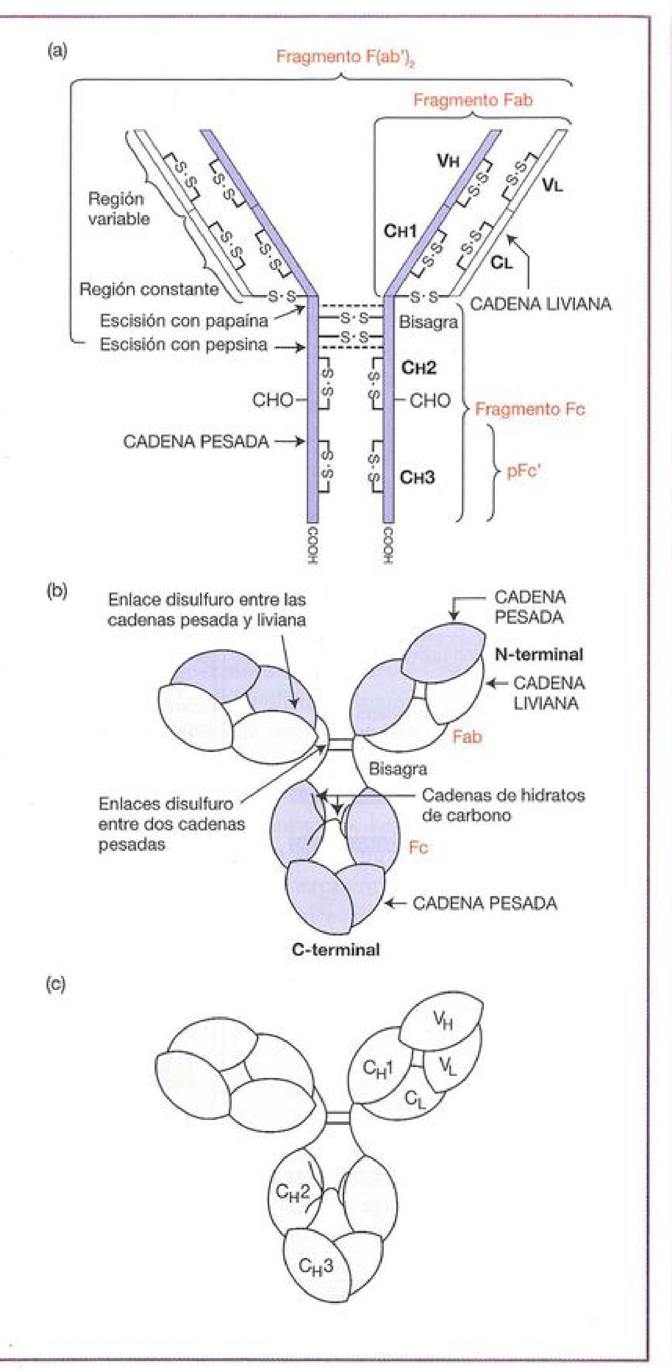
Figura A3.1.1. Unidad básica de los anticuerpos (se representa la IgG), compuesta por dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas que permanecen unidas mediante puentes disulfuro a), se puede romper para dar las cadenas polipeptídicas que la constituyen y fragmentos proteolíticos, el $F(ab')_2$ de la pepsina, que mantiene dos sitios de unión con el antígeno, y el Fab de la papaína, con un sitio de unión b). Después de la digestión por pepsina se forma el fragmento pFc' que representa la mitad C-terminal de la región Fc y se mantiene unido por enlaces no covalentes. La porción de la cadena pesada en el fragmento Fab se designa con el símbolo Fd. El residuo N-terminal se encuentra a la izquierda de cada cadena.

La molécula de IgG

En la IgG, los brazos Fab se unen al Fc por una región extensa de la cadena polipeptídica conocida como bisagra. Esta región tiende a estar expuesta y es sensible al ataque por proteasas que escinden la molécula en sus unidades funcionales distintas colocadas alrededor de la estructura tetrapeptídica (Avances y descubrimientos 3.1). Esta estructura se representa con mayor detalle en la Figura 3.2a. Las cadenas ligeras existen en dos formas conocidas como kappa (κ) y lambda (λ). En los seres humanos, las cadenas κ tienen un predominio algo mayor que λ; en los ratones, las cadenas λ son raras. Las cadenas pesadas también pueden agruparse en formas o subclases diferentes, y el número depende de las especies en consideración. En los seres humanos hay 4 **subclases** que tienen cadenas pesadas y se denominan γ1, γ2, γ3

Figura 3.2. Estructura tetrapeptídica de IgG.

a) Representación lineal. Los puentes disulfuro unen las dos cadenas pesadas, y las cadenas ligeras y pesadas. También hay una disposición regular de puentes disulfuro intracatenarios. Se representan fragmentos generados por la proteólisis en los sitios indicados. b) Representación del dominio. Cada cadena pesada (sombreado) se pliega en dos dominios en los brazos Fab, forma una región de cadena polipeptídica extendida en la bisagra y luego se pliega en dos dominios en la región Fc. La cadena ligera forma dos dominios asociados sólo con un brazo Fab. El apareamiento del dominio conduce a la interacción íntima de las cadenas pesadas y ligeras en los brazos Fab complementado por un puente disulfuro. Las dos cadenas pesadas están unidas por puentes disulfuro en la bisagra (el número de enlaces depende de la subclase de IgG) y se hallan en estrecha interacción apareada por dominio en su carboxilo terminal. c) Nomenclatura del dominio. La cadena pesada está compuesta por los dominios V_H, C_H1, C_H2 y C_H3. La cadena ligera está compuesta por los dominios V_L y C_L. Todos los dominios se aparean, salvo los dominios C_H2 que tienen dos cadenas de hidratos de carbono ramificadas unidas por N interpuestas entre ellos. Cada dominio tiene un peso molecular de alrededor de 12.000 que implica un peso molecular de cerca de 50.000 para el Fc y el Fab, y de 150.000 para la molécula de IgG completa. El reconocimiento antigénico comprende los residuos de los dominios V_H y V_L, la activación por el complemento del dominio C_H2, el receptor Fc del leucocito que une el dominio C_H2 y el receptor Fc neonatal que une los dominios C_H2 y C_H3 (véase el texto). (Adaptado de Burton D.R. Structure and function of antibodies. En: *New Comprehensive Biochemistry* series, Vol. 17: *Molecular genetic of immunoglobulin*, F. Calabi and M.S. Neuberger [eds.]. Elsevier, pp. 1-50, 1987).



y γ4, las cuales dan lugar a las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En los ratones hay también 4 subclases llamadas IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. Las subclases, en particular en los seres humanos, tienen secuencias primarias muy similares, y las mayores diferencias se observan en la región de la bisagra. La existencia de subclases es un rasgo importante en la medida que muestran disparidades en su capacidad de activar las funciones efectoras. En una molécula dada, las 2 cadenas pesadas y las 2 cadenas ligeras son idénticas. La excepción a la regla está dada por la IgG4 humana, que puede intercambiar pares de cadenas pesada-ligera entre moléculas de IgG4 para producir híbridos. Como las porciones Fc de las moléculas que se intercambian son idénticas, el efecto neto es el intercambio del brazo Fab para generar anticuerpos IgG4 que tienen dos brazos Fab diferentes y especificidad dual.

Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos han revelado mucha información acerca de su estructura y función. Sin embargo, la obtención de secuencias de anticuerpos es mucho más dificultosa que para otras proteínas porque la población de anticuerpos en un individuo es increíblemente heterogénea. La oportunidad de hacerlo llegó recién con el estudio de las **proteínas del mieloma**. En la enfermedad humana conocida como mieloma múltiple, una célula que elabora un anticuerpo particular se divide una y otra vez descontroladamente, de modo similar a lo que sucede con una célula cancerosa sin considerar los requerimientos generales del huésped. En

consecuencia, el paciente presenta enormes cantidades de células idénticas derivadas como un clon de la célula original y todas sintetizan la misma inmunoglobulina, la proteína del mieloma, que aparece en el suero, a veces en concentraciones muy elevadas. Mediante la purificación de las proteínas del mieloma pueden obtenerse preparados de un solo anticuerpo para la secuenciación y muchas otras aplicaciones. Una vía alternativa para obtener **anticuerpos monoclonales** llegó con el desarrollo de la **tecnología del hibridoma**. Aquí, la fusión de células formadoras de anticuerpo con una célula B tumoral produce un clon de células en constante división dedicada a producir ese anticuerpo. Por último, las **tecnologías de anticuerpos recombinantes** desarrolladas en los últimos tiempos proporcionan una fuente excelente de anticuerpos monoclonales.

La comparación de las secuencias de las proteínas monoclonales IgG indica que la mitad carboxilo terminal de la cadena ligera y alrededor de las tres cuartas partes de la cadena pesada, también del carboxilo terminal, muestran poca variación entre las diferentes moléculas de IgG. Por el contrario, las regiones amino terminal de cerca de 100 residuos de aminoácido presentan una considerable variabilidad de secuencia en ambas cadenas. Dentro de estas regiones variables hay secuencias relativamente cortas que tienen una extrema variación y se designan como **regiones hipervariables**. Hay 3 de estas regiones o "puntos calientes" en la cadena ligera y 3 en la cadena pesada. Como las diferentes IgG reconocen antígenos distintos, es de esperar que estas regiones hipervariables se asocien con el reconocimiento del antígeno, y de hecho a menudo se las denomina **regiones determinantes de la complementariedad** (CDR, *complementarity determining regions*). Describiremos brevemente la estructura de las regiones hipervariables en relación con su participación en el reconocimiento del antígeno y los orígenes genéticos de las regiones constantes y variables.

La comparación de las secuencias de inmunoglobulina también revela la organización de la IgG en 12 regiones de homología o **dominios**, cada una con un enlace disulfuro interno. La estructura básica del dominio es fundamental para la comprensión de la relación entre la estructura y la función en la molécula del anticuerpo, y se describirá brevemente más adelante. En la Figura 3.2b,c se muestra la estructura en forma esquemática. Vemos que la cadena ligera consta de dos dominios, uno que corresponde a la región de la secuencia variable descrita antes y designada como dominio V_L (variable-ligera) y el otro que corresponde a una región constante designada dominio C_L (constante-ligera). La cadena pesada de la IgG está formada por 4 dominios, los dominios V_H y C_H1 de los brazos Fab unidos a los dominios C_H2 y C_H3 del Fc por medio de la bisagra. La unión al antígeno es una propiedad combinada de los dominios V_L y V_H en las extremidades de los brazos Fab y la molécula efectora que une una propiedad de los dominios C_H2 y C_H3 del Fc.

También está claro (Figura 3.2b,c) que todos los dominios, salvo C_H2, están en asociación estrecha lateral o "de lado" con otro dominio: un fenómeno descrito como apareamiento de dominios. Los dominios C_H2 tienen dos cadenas de azúcares interpuestas entre ellos. Los dominios también exhiben interacciones *cis* más débiles con los dominios vecinos de la misma cadena polipeptídica.

La IgG1 humana se representa en la Figura 3.2 con una conformación en Y, con los brazos Fab casi en el mismo plano que el Fc. Ésta es la imagen clásica de la molécula de anticuerpo que ha adornado innumerables congresos médicos y aparecido en muchos logotipos de empresas. En realidad, ésta es tal vez sólo una de las muchas formas que puede adoptar la molécula de IgG ya que, como se ilustra en la Figura 3.3, es muy **flexible**. Se considera que esta flexibilidad puede ayudar a la función de la IgG. De tal manera, la flexibilidad Fab-Fab confiere al anticuerpo un "alcance variable" que le permite unirse a determinantes antigénicos de espacios diferentes sobre una superficie celular extraña o formar intrincados complejos inmunitarios con una toxina (imagine el cambio de forma Y a T). La flexibilidad de Fc-Fab puede ayudar a los anticuerpos en ambientes diferentes, por ejemplo sobre células extrañas, para interactuar de modo productivo con moléculas efectoras comunes. En la Figura 3.4 se observa la estructura completa de una molécula de anticuerpo IgG1 humano determinada por

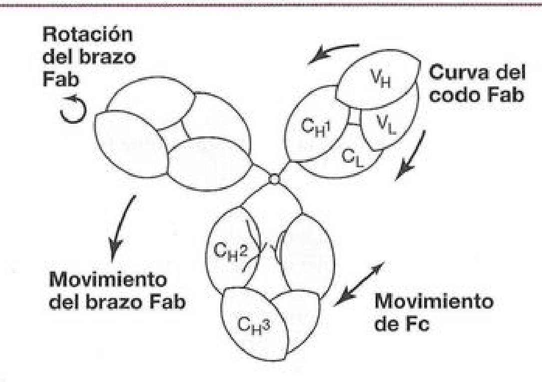


Figura 3.3. Modos de flexibilidad de la molécula de IgG.
Estos modos se han descrito a partir de estudios realizados por microscopia electrónica (véase Figura 3.10) y técnicas biofísicas en solución. Es probable que la flexibilidad en la estructura facilite la flexibilidad en el reconocimiento del antígeno y la activación de la función efectora.

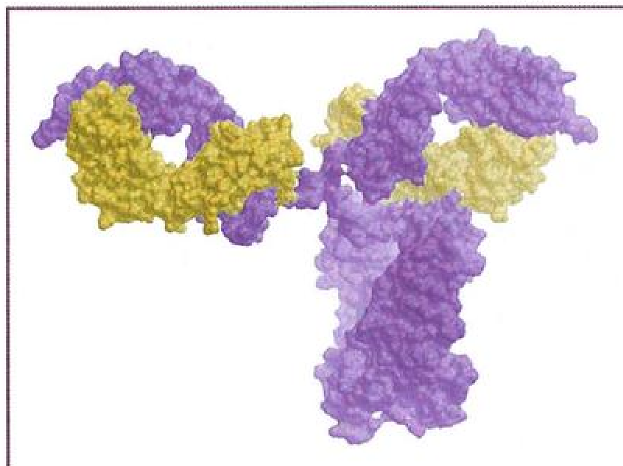


Figura 3.4. Estructura de una molécula de IgG humana.
Las cadenas pesadas se representan en violeta y las cadenas ligeras en verde. En relación con el dibujo animado clásico de una molécula de IgG con una forma de Y, esta "instantánea" de la molécula encuentra el Fc (parte inferior) "al costado" del espectador y mucho más próximo a un brazo Fab que al otro. (Cortesía de Erica Ollmann Saphire).

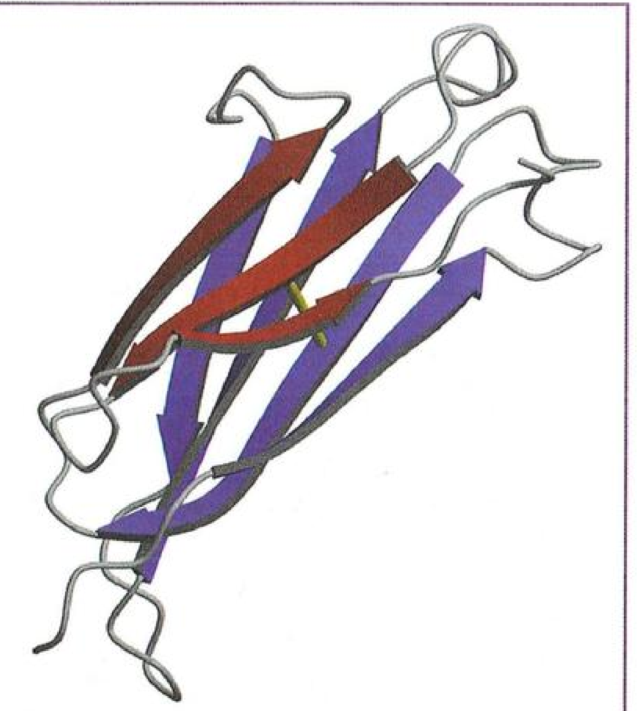


Figura 3.5. Plegamiento de la inmunoglobulina (dominio constante).

Una hoja β de tres hebras antiparalelas (rojo) interactúa con una hoja de cuatro hebras (azul). La disposición es estabilizada por un puente disulfuro que une las dos hojas. Las hebras β están conectadas por hélices, incurvaciones y otras estructuras. Una estructura global central similar se observa en todos los dominios similares a Ig, pero con algunas modificaciones, como hebras β extras o cambios en el modo en que las hebras de los bordes se aparean con las hojas β.

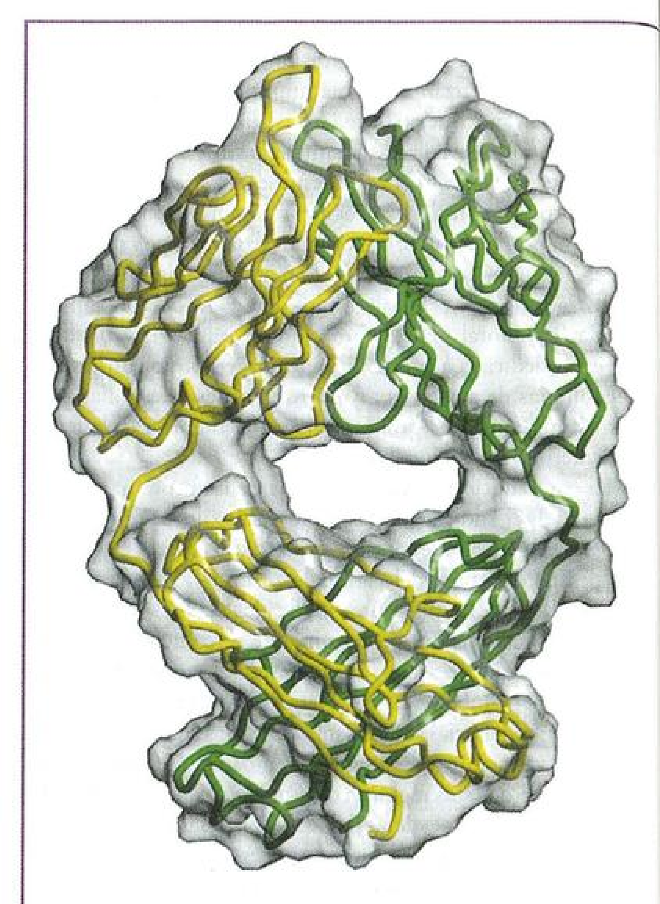


Figura 3.6. Estructura de Fab.

La cadena pesada se representa en verde y la cadena ligera, en amarillo. Los dominios V_H y V_L (parte superior) están apareados por el contacto entre sus caras de cinco hebras y los dominios C_H1 y C_L entre las caras de cuatro hebras (Cortesía de Robyn Stanfield).

cristalografía. La estructura está bastante alejada de la forma de Y simétrica clásica. El Fc se halla más próximo a un brazo Fab que a otro y se encuentra en relación con los brazos Fab. Esto es simplemente una "instantánea" de una de las muchas conformaciones que puede adoptar el anticuerpo en virtud de su flexibilidad.

La organización estructural de la IgG en dominios es bien evidente en las Figuras 3.2 a 3.4. Cada uno de estos dominios tiene un patrón común de plegamiento de la cadena polipeptídica (Figura 3.5). Este patrón, el "plegamiento de la inmunoglobulina", consiste en dos hojas β entrelazadas y apiladas que encierran en su interior residuos hidrófobos fuertemente compactados. La disposición es estabilizada por un enlace disulfuro interno que une las dos hojas en una posición central (este enlace interno se observa en la Figura 3.2a). En un dominio de Ig de tipo constante, una hoja tiene 4 hebras β antiparalelas y la otra, 3. Estas hebras o regiones de entramado están unidas por curvaturas o bucles que generalmente muestran escasa estructura secundaria. Los residuos que participan en las hojas β tienden a estar conservados, mientras que en los bucles hay una diversidad mayor de residuos. El plegamiento de la cadena ilustrado en la Figura 3.5 corresponde a un dominio constante. Las hojas β del dominio variable están más distorsionadas que las del dominio C, y el dominio V tiene un asa adicional.

Estructura del fragmento Fab

El fragmento Fab aparea dominios V_H y V_L, y dominios C_H1 y C_L (Figura 3.6). Los dominios V_H y V_L se aparean por contacto entre las dos capas respectivas de hojas β de 3 hebras (rojo en la Figura 3.5) mientras que los dominios C_H1 y C_L están apareados por el contacto entre las dos capas de 4 hebras (azul en la Figura 3.5). Las caras entrelazadas de los dominios son predominantemente hidrófobas y la fuerza impulsora para el apareamiento del dominio es, por consiguiente, la eliminación de estos residuos del ambiente acuoso. La disposición es estabilizada aún más por un enlace disulfuro entre los dominios C_H1 y C_L.

En contraste con las interacciones "laterales", las interacciones "a lo largo" o *cis* entre los dominios V_H y C_H1, y entre los dominios V_L y C_L están muy limitadas y permiten las "incurvaciones acodadas". Los ángulos del acodamiento vistos en las estructuras cristalográficas varían entre 117° y 249°.

Sitio de combinación del anticuerpo

La comparación de la secuencia del anticuerpo y los datos estructurales muestran el modo en que los anticuerpos pue-

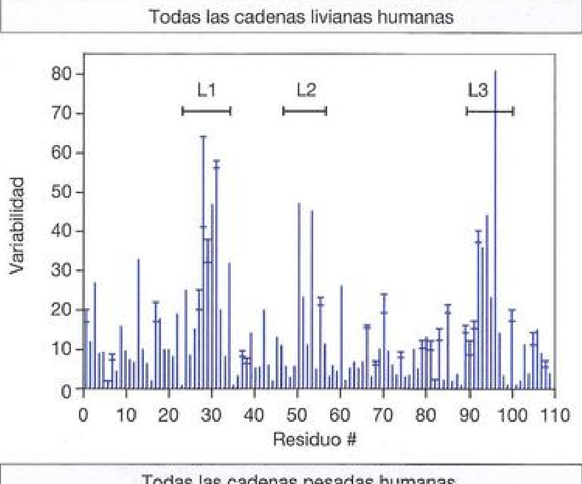
den reconocer un espectro muy variado de moléculas. Los datos de secuencia muestran que los dominios variables tienen 6 regiones hipervariables que despliegan gran diversidad en los aminoácidos entre las diferentes moléculas de anticuerpos (Figura 3.7). Los datos estructurales de los complejos antígeno-anticuerpo revelan que estas regiones hipervariables, o regiones determinantes de la complementariedad, se unen en un espacio tridimensional para formar el sitio de unión con el antígeno, a menudo también conocido como **sitio de combinación del anticuerpo** (Figura 3.8). (Cortesía de Robyn Stanfield.)

Estructura del Fc

En el caso del Fc de la IgG (Figura 3.9), los dos dominios C_H3 están pareados del modo clásico mientras que los dos dominios C_H2 no muestran ninguna interacción íntima, pero se interponen entre ellos dos cadenas ramificadas de hidratos de carbono unidas por N que tienen un contacto limitado entre sí. Las cadenas de hidratos de carbono son muy heterogéneas. Los dominios C_H2 contienen los sitios de unión para varias moléculas efectoras importantes, en particular receptores de la fracción C1q del complemento y Fc, como se muestra. El receptor Fc neonatal, que es importante en la unión a la IgG y en el mantenimiento de su vida media prolongada en el suero, se une a un sitio formado entre los dominios C_H2 y C_H3. La proteína A, muy empleada en la purificación de las IgG, también se une en este sitio.

La región bisagra y las subclases de IgG

El término **bisagra** surgió de las microfotografías electrónicas de la IgG de conejo que mostraron que los brazos Fab asumían ángulos relativos diferentes entre sí, desde casi 0° (con forma de Y aguda) a 180° (con forma de T). El Fab fue específico para un grupo químico pequeño dinitrofenilo (DNP) que podía estar adherido a cada extremo de una cadena hidrocarbonada. Como se ilustra en las Figuras 3.10 y 3.11, se observaron formas diversas cuando los brazos Fab se unían a la molécula divalente del antígeno utilizando ángulos diferentes del brazo Fab-Fab. Otras técnicas biofísicas demostraron la flexibilidad de la bisagra en solución. Por lo general se ha observado que la función de esta flexibilidad permite el reconocimiento divalente de los determinantes antigénicos espaciados de modo variable. La clase de anticuerpo IgG en los seres humanos se presenta con 4 subclases, y la máxima diferencia entre las subclases está en la naturaleza y la longitud de la bisagra. La IgG1 fue la que se



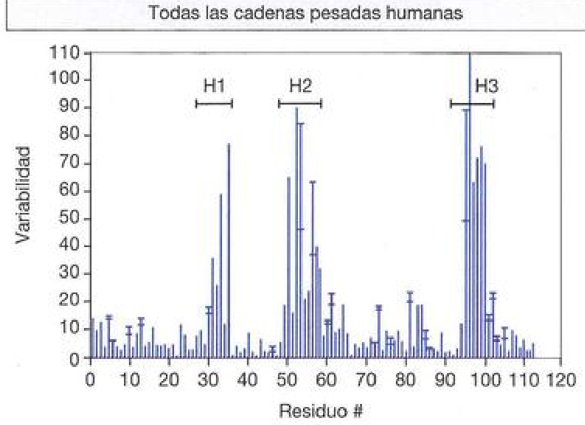


Figura 3.7. Variabilidad de aminoácidos en los dominios V de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina humana.

La variabilidad, para una posición dada, se define como la relación del número de residuos diferentes en esa posición comparada con la frecuencia del aminoácido más común. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) se evidencian como picos en el gráfico mientras que el entramado, como regiones intermedias de variabilidad baja. (Del Dr. E.A. Kabat).

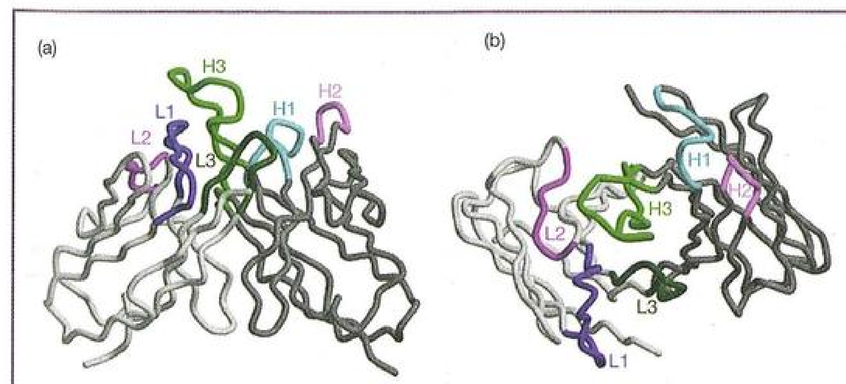


Figura 3.8. La proximidad de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR o asas variables) en el extremo de los brazos Fab crea el sitio de combinación del anticuerpo.

Se muestran los dominios V_H y V_L visto lateralmente a) y desde arriba b). Las seis CDR (véase figura 3.7) están numeradas del 1 al 3 para las cadenas pesada (H) y ligera (L). (Cortesía de Robyn Stanfield).

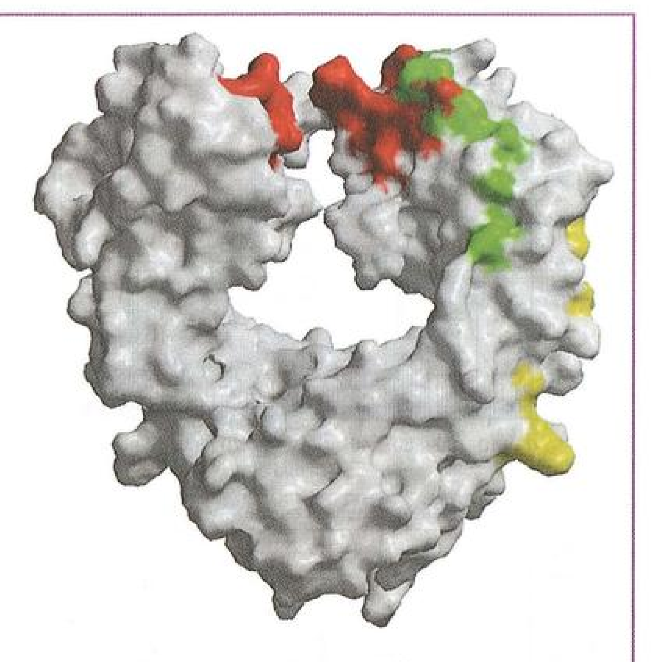


Figura 3.9. Estructura del Fc de la IgG humana.

Los dominios C_H3 (parte inferior) están apareados. Los dominios C_H2 no lo están y tienen dos cadenas de hidratos de carbono que llenan parte del espacio entre sí. Se muestran los sitios de unión para el leucocito como el receptor FcγRIII (rojo), el complemento C1q (verde) y el receptor Fc neonatal FcRn (amarillo). Los sitios FcγRIII y FcRn fueron determinados por estudios cristalográficos (Sondermann et al. [2000]. *Nature* **406**, 267; Martin et al. [2001], *Molecular Cell* **7**, 867) y el sitio C1q por análisis de mutación (Idusogie et al. [2000] *Journal of Immunology* **164**, 4178). (Cortesía de Robyn Stanfield).

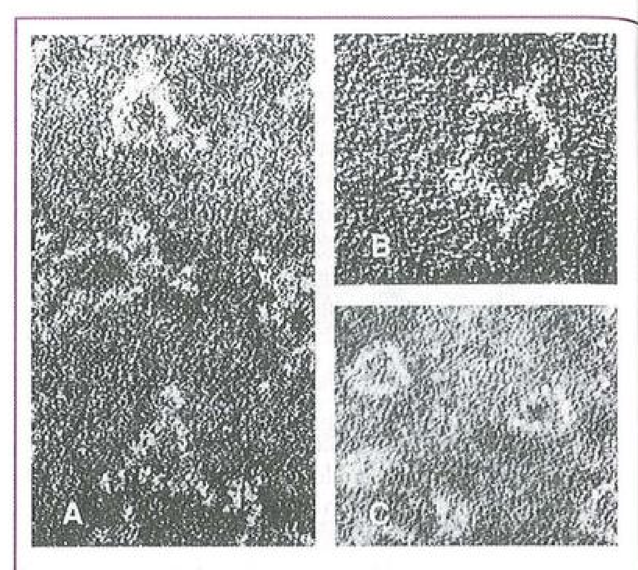


Figura 3.10. a) y b) Micrografía electrónica (×1.000.000) de complejos formados por la mezcla del hapteno dinitrofenilo (DNP) divalente con anticuerpos contra DNP de conejo. La "tinción negativa" con ácido fosfotúngstico es una solución electrodensa que penetra en los espacios entre las moléculas de proteína. Así, la proteína se destaca como una estructura "luminosa" en el haz de electrones. El hapteno se une a las moléculas de anticuerpo en forma de Y para originar trímeros a) y pentámeros b). La flexibilidad de la molécula en la región de la bisagra se evidencia por la variación en el ángulo de los brazos de la "Y". c) Como en a), pero los trímeros se formaron utilizando el fragmento de anticuerpo $F(ab')_2$ a partir de los cuales se habían digerido con pepsina las estructuras Fc (×500.000). Los trímeros pueden verse por la falta de proyecciones Fc en cada ángulo evidente en a). (De Valentine R.C. y Green N.M. [1967] *Journal of Molecular Biology* **27**, 615; cortesía del doctor Green y con autorización de Academic Press, Nueva York).

describió antes. La IgG3 tiene una bisagra que si estuviera totalmente extendida tendría cerca del doble de la longitud del Fc, lo cual coloca potencialmente los brazos Fab muy alejados del Fc. Por otro lado, IgG2 e IgG4 tienen bisagras cortas y compactas; es probable que esta característica conduzca a un acercamiento estrecho entre Fab y Fc. Es interesante destacar que IgG1 e IgG3 suelen ser superiores en la mediación de las funciones efectoras, como activación del complemento y CCDA relacionada con IgG2 e IgG4.

Estructura y función de las clases de inmunoglobulina

Las clases de inmunoglobulina (Cuadro 3.1) cumplen funciones distintas en la defensa inmunitaria y esto puede relacionarse con diferencias en sus estructuras organizadas alrededor de la disposición tetrapeptídica del dominio de inmunoglobulina (Figura 3.12). La **IgG** es monomérica y constituye el principal anticuerpo en el suero y en los tejidos no mucosos, donde inactiva a los patógenos de manera directa y a través de la interacción con moléculas que activan a los efectores, como el complemento y los receptores Fc. La **IgM** es pentamérica, se encuentra en el suero y es muy eficaz en la activación del complemento. Una forma monomérica de IgM con una secuencia adherida a la membrana es el principal receptor de anticuerpo

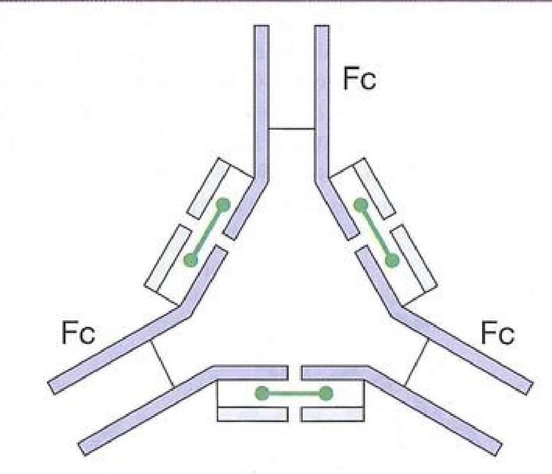


Figura 3.11. Tres moléculas de anticuerpo contra dinitrofenilo (DNP) se mantuvieron unidas como un trímero por el antígeno divalente (●—●).
Compárese con la figura 3.10a. Cuando los fragmentos Fc son eliminados por la pepsina, ya no se visualizan más las porciones de los ángulos (Figura 3.10c).

Cuadro 3.1. Inmunoglobulinas humanas

Clase (designación de la cadena pesada)	Subclases humanas	Principales formas moleculares	Polipéptidos	Localización principal	Activación del complemento (vía)
IgG (γ)	IgG1 IgG2 IgG3 IgG4	Monómero	γ2, L2	Suero (~12 mg/mL), tejidos	IgG3 > IgG1 >> IgG2 >> IgG4 (clásica)
IgA (α)	IgA1 IgA2	Monómero Dímero Secretora	α2, L2 $(\alpha 2, L2)_2$, J $(\alpha 2, L2)_2$, J SC	Suero (~3 mg/mL): 90% monómero, 10% dímero Secreciones seromucosas, leche, calostro, lágrimas	Sí (lectina de unión a manosa)
IgM (μ)		Pentámero	$(\mu 2, L2)_5$, J	Suero (~1,5 mg/mL)	Sí (clásica)
IgE (ε)		Monómero	ε2, L2	Suero (0,05 μg/mL)	No
IgD (δ)		Monómero	δ2, L2	Suero (30 μg/mL)	No

utilizado por los linfocitos B para reconocer el antígeno (véase Figura 2.11). La IgM difiere de la IgG porque tiene un par de dominios constantes adicionales en lugar de la región bisagra. La **IgA** se encuentra en 3 formas solubles. La IgA monomérica y cantidades pequeñas de la dimérica (formada por dos monómeros unidos por un polipéptido adicional conocido como cadena J) se encuentran en el suero, donde pueden contribuir a la unión de los patógenos con las células efectoras por medio de los receptores Fc específicos para IgA. La IgA secretora (véase luego) está formada por IgA dimérica y una proteína adicional conocida como componente secretor, y es crucial para proteger las superficies mucosas del cuerpo contra el ataque por microorganismos. La IgA existe como dos subclases en los seres humanos. La IgA2 tiene una bisagra mucho más corta que la IgA1 y es más resistente al ataque por las proteasas secretadas por las bacterias. La **IgE** es un anticuerpo monomérico que se suele hallar en concentraciones muy bajas en el suero. De hecho, es probable que la mayor parte de la IgE esté unida a los receptores Fc para IgE en los mastocitos. La unión del antígeno a la IgE establece entrecruzamientos de los receptores Fc para IgE y activa una reacción inflamatoria aguda que puede ayudar en la defensa inmunitaria. Esto también puede producir síntomas alérgicos no deseados a ciertos antígenos (alérgenos). La IgE, como la IgM, tiene un par adicional de dominios constantes en lugar de la región bisagra. Por último, la **IgD** es un anticuerpo encontrado sobre todo en la superficie de las células B como receptor antigénico junto con la IgM, donde es probable que actúe en el control de la activación y la supresión de los linfocitos. Es monomérica y tiene una región bisagra larga.

En la Figura 3.13 se determinaron y comparan las estructuras de las regiones de Fc de la IgA1 y la IgE humanas (dominios C-terminal) con la de la IgG1. En los tres casos, los dominios penúltimos no están apareados y presentan cadenas de hidratos de carbono interpuestas entre sí.

Anticuerpos y complemento

La agrupación de moléculas de IgG, por lo general sobre la superficie de un patógeno como una bacteria, conduce a la unión de la molécula C1 del complemento por medio del subcomponente hexavalente C1q (véase Figura 2.2). Esto activa la vía clásica del complemento y varios procesos que pueden llevar a la eliminación del patógeno. Las subclases de IgG activan al complemento con eficacias diferentes. La IgG1 y la IgG3 lo activan mejor; la IgG2 sólo lo activa por antígenos con concentraciones elevadas como los hidratos de carbono de una bacteria, y la IgG4 no lo activa.

La IgM lo activa por un mecanismo diferente. Es multivalente (pentavalente) pero aparece como forma inactiva. La unión al antígeno multivalente alteraría la estructura de la molécula de IgM para exponer los sitios de unión que le permiten unirse a C1q y activar la vía clásica del complemento. Los estudios de microscopia electrónica sugieren que el cambio de estructura es una transición de "estrella" a "grapa" en la que los brazos Fab se desplazan hacia fuera del plano de los Fc (Figura 3.14). Los anticuerpos IgM tienden a presentar baja afinidad medida en una interacción univalente, por ejemplo, la unión de IgM a una molécula monomérica soluble o la unión de un Fab aislado de una IgM a un antígeno. Sin embargo, su afinidad funcional (avidez) puede ser reforzada por la interacción antígeno-anticuerpo multivalente, y es precisamente en estas circunstancias cuando son más eficaces en la activación del complemento.

Anticuerpos y receptores Fc de leucocitos humanos



Se han descrito receptores Fc humanos específicos para IgG, IgA e IgE (Cuadro 3.2). Los receptores difieren en sus especificidades para las clases y las subclases de anticuerpos, sus afinidades para los diferentes estados de asociación de los anticuerpos (anticuerpo monomérico o complejo anticuerpo-antígeno asociado), sus distribuciones en los diferentes tipos de leucocitos y sus mecanismos de señalización celulares. Los receptores Fc de leucocitos en su mayor parte están estructuralmente relacionados, tras haber evolucionado como miembros de la superfamilia de genes de las inmunoglobulinas. Cada uno comprende una cadena de unión al ligando única (cadena α), que a menudo forma un comple-

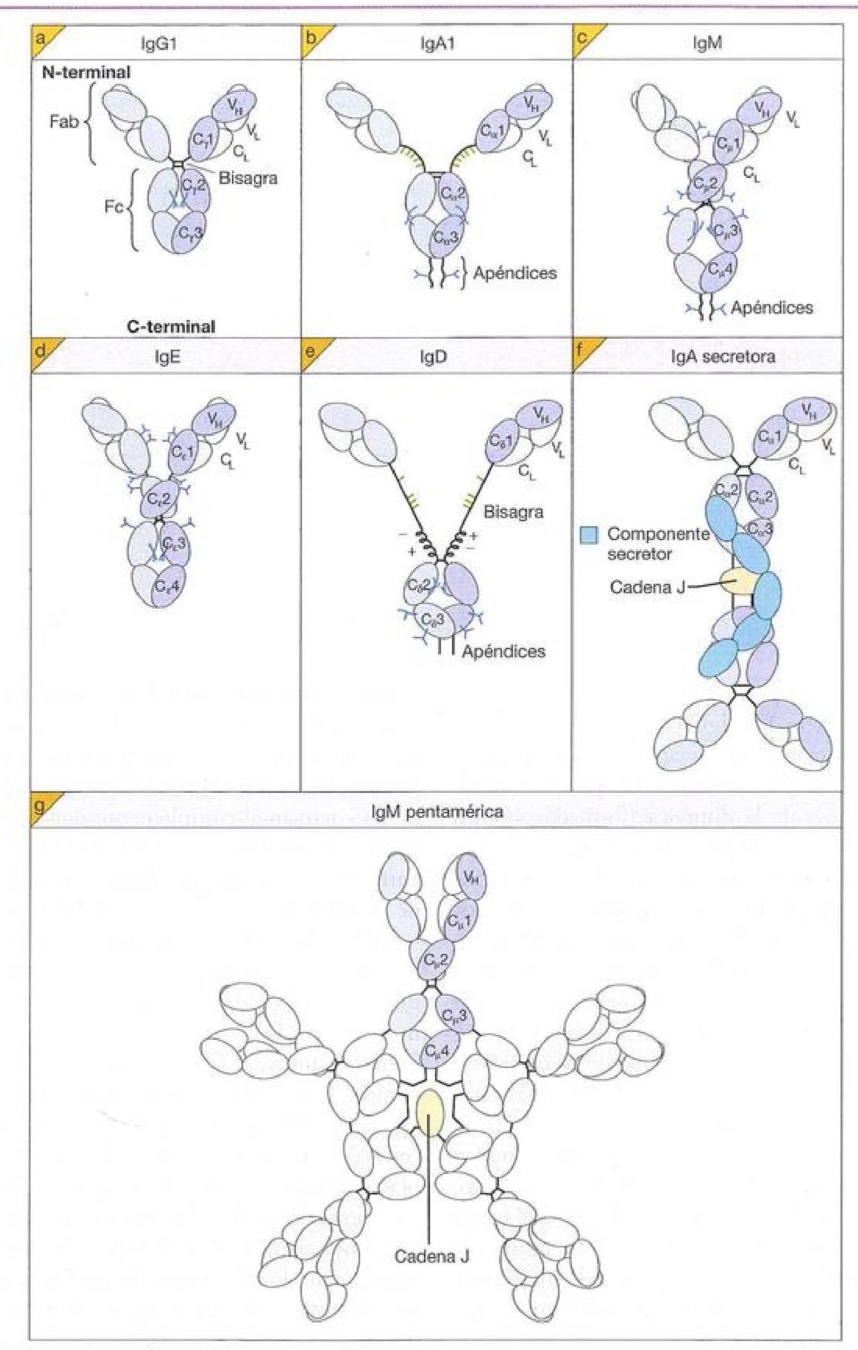


Figura 3.12. Estructuras esquemáticas de las clases de anticuerpos.

Las dos cadenas pesadas se observan en azul oscuro y claro (dos colores para resaltar el apareamiento de la cadena; las cadenas son idénticas) y las cadenas ligeras en gris. Las cadenas de hidratos de carbono unidos por N (estructuras ramificadas) se representan en azul y los hidratos de carbono unidos por O (estructuras lineales), en verde. Los dominios de la cadena pesada se designan según la clase de la cadena pesada; por ejemplo, $C\gamma2$ para el dominio C_H2 de IgG, etc. Para IgG, IgA e IgD, el Fc se conecta con los brazos de Fab por medio de una región bisagra; para IgM e IgE un par adicional de dominios reemplaza la bisagra. IgA, IgM e IgD tienen apéndice en el C terminal de las cadenas pesadas. La IgA aparece como monómeros o dímeros. La IgM forma un pentámero. a) IgG1. Las otras subclases de IgG humanas (y las IgG de la mayoría de las otras especies) tienen esta misma estructura básica, pero difieren particularmente en la naturaleza y la longitud de la bisagra. b) IgA1. La estructura se asemeja a la de la IgG1, aunque la bisagra es relativamente larga y presenta cadenas de azúcar unidas por O. El Fc también muestra algunas diferencias con la IgG1 (véase Figura 3.13). En la IgA2, la bisagra es muy corta, y en el alotipo predominante, las cadenas ligeras están unidas por puentes disulfuro, no a la cadena pesada sino entre sí. c) Unidad monomérica de IgM. Esta representación se basa en gran parte en la comparación de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas μ y γ. d) IgE. La molécula es similar a la unidad monomérica de IgM. e) IgD. La bisagra puede ser dividida en una región con gran carga (posiblemente helicoidal) y una con gran cantidad de azúcares unidos por O. La estructura de la bisagra puede estar mucho menos extendida en la solución que la representada aquí de modo esquemático. Sin embargo, es muy sensible al ataque proteolítico, de modo que la IgD sérica es inestable. La IgD de ratón tiene una estructura muy diferente de la de la IgD humana, al contrario de la similitud general que presentan las estructuras de las inmunoglobulinas humanas y murinas. f) IgA secretora (también véase figura 3.19). g) IgM pentamérica. La molécula está representada como una forma de estrella plana. Se muestra una unidad monomérica sombreada como en (c). Para mayor claridad se han omitido las estructuras de hidratos de carbono en f) y g). Los brazos de Fab probablemente pueden girar fuera del plano sobre su eje de dos pliegues (también véase figura 3.14).

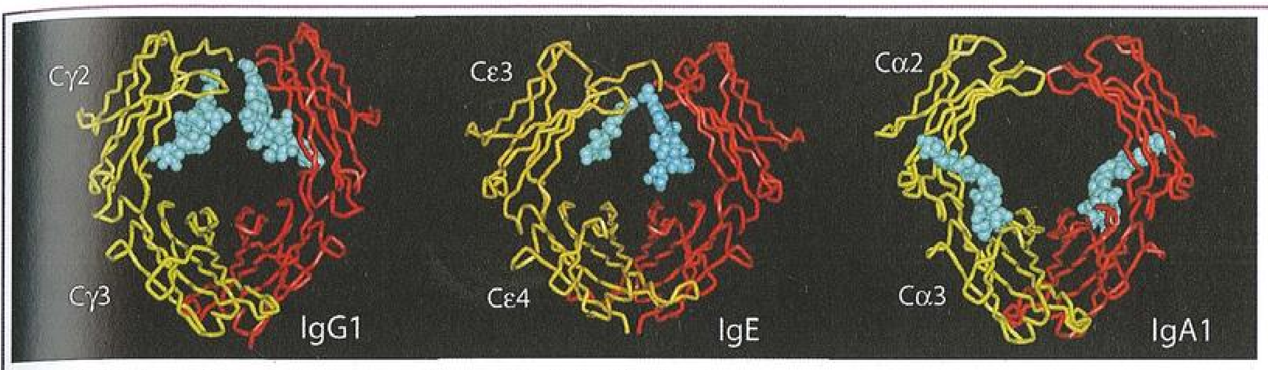


Figura 3.13. Estructuras de las regiones Fc de IgG1, IgE e IgA1 humanas.

Las estructuras ilustradas se determinaron por análisis cristalográfico de los Fc en el complejo con los receptores Fc. Una cadena pesada se muestra en rojo y la otra en amarillo, y las cadenas de hidrato de carbono unidas por N que se interponen entre los penúltimos dominios se representan en azul. En la IgE, la estructura no incluye los dominios Cε2 que forman parte de la región Fc de este anticuerpo. En la IgA1 los azúcares unidos por N están fijados en una posición bastante distinta de la de la IgG1 y la IgE. También los extremos del dominio Cα2 se hallan unidos por un puente disulfuro (Cortesía de Jenny Woof; de Woof J.M. and Burton D.R. [2004] *Nature Reviews Immunology* **4**, 89-99).

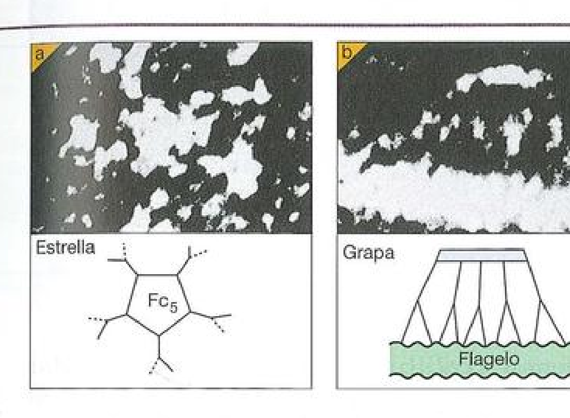


Figura 3.14. Cambios estructurales en la IgM asociados con la activación del complemento.

a) Estructura "en estrella". La microscopia electrónica de la proteína IgM muestra una estructura con forma "de estrella" (véase figura 3.12g). b) Estructura "en grapa" o "en cangrejo". La microscopia electrónica de una IgM específica de carnero unida al flagelo de *Salmonella paratyphi* como antígeno sugiere que las cinco unidades $F(ab')_2$ y los dominios Cμ2 se han desplazado en relación con el plano de los Fc para producir la conformación "en grapa" o "en cangrejo". La fracción C1 del complemento es activada en la unión del antígeno-complejo de IgM (grapa), pero sólo interactúa de modo muy débil, lo cual no determina la activación significativa y queda IgM libre (estrella); esto implica que el proceso de desplazamiento desempeña una función importante en la activación del complemento. Se sugiere que el movimiento de las fracciones Fab expone el sitio de unión a C1q en los dominios Cμ3 de la IgM. Esto es avalado por observaciones de que una molécula Fc5, obtenida por digestión con papaína de la IgM, puede activar el complemento directamente en ausencia de antígeno. (Las microfotografías electrónicas son preparados con tinciones negativas y un aumento de 2×10^6, es decir que 1 mm representa 0,5 nm; cedidas gentilmente por los doctores A. Feinstein y E.A. Munn).

jo por medio de su región transmembrana con un dímero de la cadena común FcRγ. Esta última desempeña un papel importante en las **funciones de señalización** de muchos de los receptores. Las cadenas FcRγ tienen motivos de activación de inmunorreceptor basados en tirosina (ITAM) en sus regiones citoplasmáticas, fundamentales para la iniciación de las señales activadoras. Algunas cadenas α del receptor portan sus propios ITAM en sus regiones citoplasmáticas, mientras que otras presentan motivos de inhibición de inmunorreceptor basados en tirosina (ITIM).

En el caso de la IgG se han caracterizado 3 clases diferentes de FcγR de leucocitos humanos, la mayoría con diversas variantes. Además, el receptor Fc neonatal, FcRn, también se une a la IgG y se describirá más adelante. **FcγRI** (CD64) se caracteriza por su alta afinidad por la IgG monomérica. También se diferencia porque tiene 3 dominios extracelulares similares a inmunoglobulina en su cadena de unión al ligando, mientras que el resto de los otros receptores Fc tienen dos. FcγRI es un componente constitutivo de los monocitos, los macrófagos y las células dendríticas, y es inducido en neutrófilos y eosinófilos tras su activación por IFNγ y G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos). A la inversa, FcγRI puede ser regulado negativamente en respuesta a IL-4 e IL-13. Desde el punto de vista estructural, consiste en una cadena α de unión a la IgG y una cadena γ homodimérica que contiene ITAM. Fija con avidez la IgG monomérica a la superficie de la célula de modo tal que la sensibiliza para el encuentro ulterior con el antígeno. Es probable que sus funciones principales se relacionen con los procesos tendientes a facilitar la fagocitosis, la presentación del antígeno y la mediación de la destrucción de las células diana recubiertas por anticuerpo IgG, proceso conocido como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA).

FcγRII (CD32) se une de manera muy débil a la IgG monomérica pero con afinidad considerablemente aumentada a la IgG asociada, como sucede en los inmunocomple-

Cuadro 3.2. Receptores Fc de los leucocitos humanos. (De Woof J.M. y Burton D.R. (2004) *Nature Reviews Immunology* 4, 89)

PM (kDa)	FcγRI (CD64)	FcγRII (CD32)				FcγRIII (CD16)		FcεRI	FcεRII (CD23)		FcαRI (CD89)
	50-70	40				50-80		45-65	45-50		50-70
Principales isoformas expresadas	FcγRIa	FcγRIIa		FcγRIIb	FcγRIIc	FcγRIIIa	FcγRIIIb	FcεRI	FcεRIIa	FcεRIIb	FcαRIa
Alotipos		LR	HR					NA1 and NA2			
Especificidad para la Ig humana*	IgGI = 3 > 4 IgG2 no se une	IgG3 ≥ 1 = 2 IgG4 no se une	IgG3 ≥ 1 >>> 2 IgG4 no se une	IgG3 ≥ 1 >> 2 > 4	ND	ND	IgGI = 3 >>> 2 = 4	IgE	IgE		IgAI sérica = 2, SIgAI = SIgA2
Afinidad para el monómero de Ig (M^{-1})	Alta (10^8-10^9)	Baja (< 10^7)	Baja (< 10^7)	Baja (< 10^7)	Baja (< 10^7)	Media (10^7)	Baja (< 10^7)	Muy alta (10^{10})	Baja (< 10^7)		Media (10^7)
Motivo de señalización	ITAM cadena γ	ITAM cadena α		ITAM cadena α	ITAM cadena α	ITAM cadena γ	Ningún motivo de señalización. Fijado en la membrana por medio de la unión con glucosilfosfatidilinositol (GPI)	ITAM cadena γ también presente la cadena β, pero con función incierta	Lectina tipo C	Lectina tipo C	ITAM cadena γ
Distribución celular	Monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos (estimulados por IFNγ), eosinófilos (estimulados por IFNγ)	Monocitos, macrófagos, neutrófilos, plaquetas, células de Langerhans		Monocitos, macrófagos, células B	Monocitos, macrófagos, neutrófilos, células B	Macrófagos, células NK, células T γδ, algunos monocitos	Neutrófilos, eosinófilos (estimulados por IFNγ)	Mastocitos, basófilos, células de Langerhans, monocitos activados	Células B	Células B, células T, monocitos, eosinófilos, macrófagos	Neutrófilos, monocitos, algunos macrófagos, eosinófilos, células de Kupffer, algunas células dendríticas

* Se indican las afinidades relativas de varios ligandos para cada receptor en orden decreciente con el isotipo con mayor afinidad. Las puntas de flecha y los signos igual se utilizan para mostrar las diferencias de afinidad.

jos o en una célula diana recubierta por anticuerpo. Por consiguiente, las células que tienen FcγRII pueden unirse a elementos diana recubiertos por anticuerpo en presencia de concentraciones séricas elevadas de IgG monomérica. A diferencia de la única isoforma de FcγRI, hay múltiples isoformas expresadas de FcγRII que, en conjunto, están presentes en la superficie de la mayoría de los tipos de leucocitos (Cuadro 3.2). La unión de complejos de IgG con FcγRII activa las células fagocíticas y puede provocar trombosis mediante su reacción con las plaquetas. FcγRIIa son receptores activadores expresados en los fagocitos que participan en la fagocitosis y la CCDA. Por el contrario, los FcγRIIb son receptores inhibidores que tienen dominios citoplasmáticos que contienen ITIM, y su ocupación lleva a una regulación negativa de la capacidad de respuesta celular. El FcγRIIb aparece en dos isoformas generadas por corte y empalme alternativo. El Fc-γRIIb1, presente en las células B, forma entrecruzamientos con los receptores de células B (BCR) y transmite una señal inhibidora para inactivar la célula B con un efecto de retroalimentación negativa en la producción de anticuerpos. FcγRIIb2 se expresa en los fagocitos, donde media de manera eficaz la endocitosis que conduce a la presentación del antígeno.

El **FcγRIII** (CD16) también se une de manera bastante deficiente a la IgG monomérica pero tiene afinidad baja a media por la IgG agregada. Los dos genes *FcγRIII* codifican las isoformas FcγRIIIa y Fc-γRIIIb que tienen afinidad media y baja por la IgG, respectivamente. FcγRIIIa se encuentra en la mayoría de los tipos de leucocitos, mientras que FcγRIIIb está limitado sobre todo a los neutrófilos, y es el único entre los receptores Fc que se adhiere a la membrana celular por un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI) en lugar de hacerlo por un segmento transmembrana. Se sabe que FcγRIIIa se asocia con la cadena dimérica de señalización γ situada sobre monocitos y macrófagos, y con las moléculas de señalización ξ, γ o ambas en las células NK; su expresión está regulada de modo positivo por el factor transformador del crecimiento β (TGFβ) y de modo negativo por la IL-4. Con respecto a sus funciones, el FcγRIIIa participa sobre todo en la CCDA por las células NK y en la eliminación de los inmunocomplejos de la circulación por los macrófagos. Por ejemplo, la eliminación de eritrocitos recubiertos por IgG de la sangre de chimpancés fue en esencia inhibida por el fragmento Fab monovalente de un anticuerpo monoclonal contra el FcγRIII. Los entrecruzamientos de FcγRIII estimulan la producción de superóxido por los neutrófilos.

Para la IgE se han descrito dos FcγR diferentes. La unión de la IgE a su receptor **FcεRI** se caracteriza por una afinidad de interacción muy alta, lo cual refleja una velocidad de disociación muy lenta (la vida media del complejo es ~20 horas). FcγRI es un complejo constituido por una cadena β

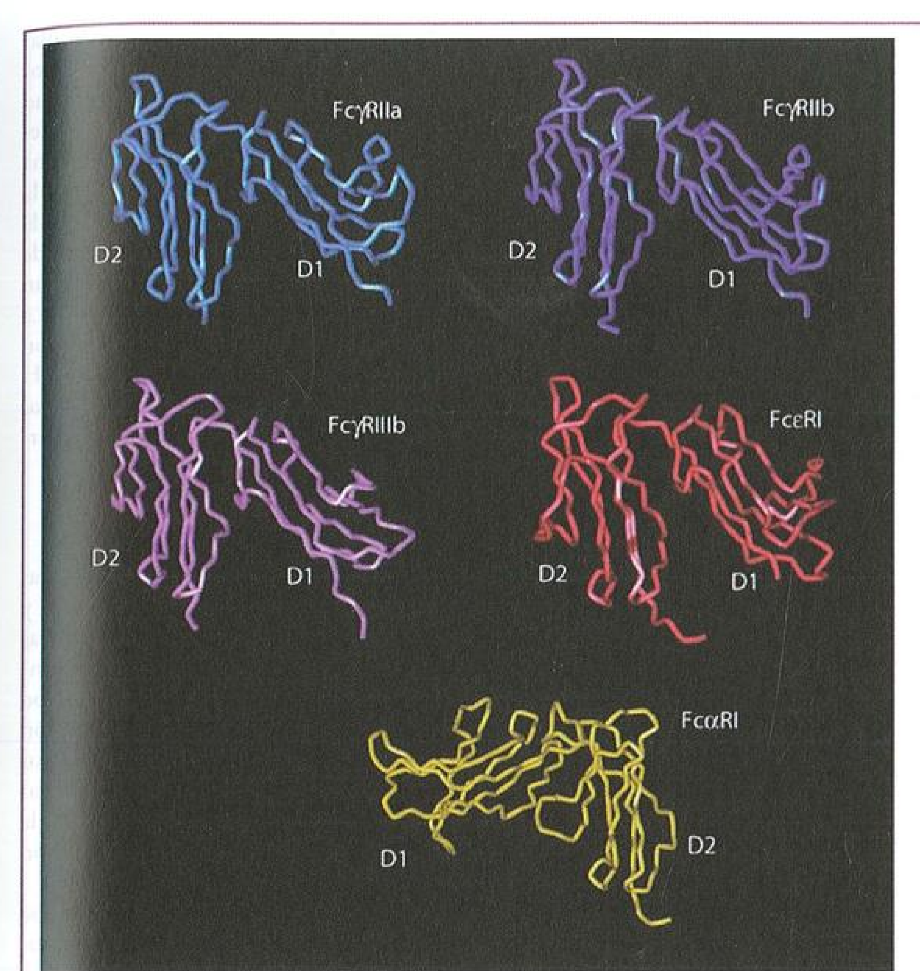


Figura 3.15. Estructuras de los receptores Fc de los leucocitos humanos.

En cada caso se muestra una vista similar del receptor, en el estado no acomplejado. D1, distal a la membrana; D2, dominio proximal a la membrana. Para los receptores FcγR y FcεRI, el sitio de unión Fc está presente en la "parte superior" del dominio D2. Para FcαRI, la disposición del dominio D1-D2 se invierte y el sitio de interacción Fc está presente en el extremo superior del dominio D1. (Cortesía de Jenny Woof).

de unión al ligando estructuralmente relacionada con la de FcγR, una cadena β y el dímero de cadena FcRγ. El contacto con el antígeno conduce a la desgranulación de los mastocitos con la liberación de aminas vasoactivas preformadas y citocinas, y la síntesis de una diversidad de mediadores inflamatorios derivados del ácido araquidónico (véase Figura 1.21). Este proceso es el determinante de los síntomas de la fiebre del heno y el asma extrínseco cuando los pacientes con alergia atópica entran en contacto con el alérgeno, por ejemplo, el polen de gramíneas. La función *fisiológica* principal de la IgE parece ser la protección de sitios anatómicos susceptibles a traumatismos y el ingreso del patógeno por el reclutamiento local de factores plasmáticos y células efectoras a través de la **activación de una reacción inflamatoria aguda**. Los agentes infecciosos que vencen las defensas de la IgA se combinarían con la IgE específica presente sobre la superficie de los mastocitos y activarían la liberación de agentes vasoactivos y factores quimiotácticos para los polimorfonucleares, lo cual lleva a un aflujo de IgG plasmática, complemento, neutrófilos y eosinófilos. En este contexto, la capacidad de los eosinófilos para dañar los helmintos recubiertos por IgG y la respuesta generosa de IgE frente a estos parásitos constituiría una defensa eficaz.

El receptor de IgE de baja afinidad **FcεRII** (CD23) es una lectina de tipo C (dependiente del calcio). Está presente en muchas clases de células hematopoyéticas (Cuadro 3.2). Su función principal parece ser la regulación de la síntesis de IgE por las células B, con acción estimuladora en concentraciones bajas de IgE, e inhibidora en concentraciones elevadas. También puede facilitar la fagocitosis de antígenos opsonizados por IgE.

Para la IgA, **FcαRI** (CD89) es el único receptor Fc bien caracterizado. Su cadena α de unión al ligando se relaciona de modo estructural con la de los receptores FcγR y FcεRI, pero representa un miembro de la familia relacionado más distante. De hecho, comparte homología más estrecha con los miembros de una familia que incluye a los receptores similares a la inmunoglobulina de las células *natural killer* (KIR), los receptores similares a la inmunoglobulina de los leucocitos (LIR/LILR/ILT) y el receptor de colágeno específico de las plaquetas (GPVI). FcαRI está presente en monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y células de Kupffer. El entrecruzamiento de FcαRI con el antígeno puede activar la endocitosis, la fagocitosis, la liberación del mediador inflamatorio y la CCDA. La expresión de FcαRI en los monocitos es fuertemente regulada de modo positivo por los polisacáridos bacterianos.

En la Figura 3.15 se observan las estructuras obtenidas por cristalografía de FcγRIIa, FcγRIIb, Fc-γRIIIb, FcεRI y FcαRI. En todos los casos, las estructuras representan los dos dominios extracelulares similares a inmunoglobulina de la cadena α del receptor, denominados D1 (N-terminal, dis-

tal de la membrana) y D2 (C-terminal, proximal de la membrana). Aún no se dispone de ninguna estructura para las porciones citoplasmáticas de cualquiera de los receptores. Se observa que las regiones extracelulares de FcγRIIa/b, FcγRIII y FcεRI comparten la misma estructura global de forma acorazonada y son tan similares que pueden superponerse con facilidad. A pesar de la similitud de la secuencia básica entre FcαRI y estos receptores, el receptor para IgA presenta una estructura muy diferente. Mientras los dos dominios de la porción extracelular de FcαRI se pliegan de una manera similar a la de los otros receptores, la disposición de los dominios entre sí es muy diferente. Los dominios están rotados alrededor de 180° respecto de las posiciones adoptadas en los otros receptores Fc, lo cual invierte esencialmente las orientaciones D1-D2.

Los estudios cristalográficos de los complejos anticuerpo-receptor Fc han revelado el modo en que los anticuerpos interactúan con los receptores Fc de los leucocitos (Figura 3.16). Para la interacción IgG-FcγRIII, el dominio D2 proximal a la membrana de FcγRIII interactúa con la parte superior de los dominios C_H2 y la parte inferior de la bisagra. Esto requiere que el anticuerpo adopte una conformación "dislocada" en la que los brazos de Fab giran fuera del plano del Fc. Una consecuencia de este modo de interacción, reconocido hace muchos años, es que favorece el acercamiento íntimo de la membrana de la célula diana (hacia arriba en la página) a la membrana de la célula efectora. Esto puede favorecer la actividad de la célula efectora contra la célula diana. Dadas las similitudes entre FcγRI, FcγRII y FcγRIII, es probable que los 3 FcR compartan un modo común de unión a la IgG. Por cierto, este modo de unión también parece ser compartido por la IgE en su unión con el receptor FcγRI aunque la región del dominio conector Cε2-Cε3 remplaza la contribución de la bisagra a la unión del receptor. Por el contrario, la IgA se une al receptor FcαRI en un sitio entre los dominios Cα2 y Cα3. Este modo de unión permite una estequiometría de IgA:FcR de 2:1, mientras que la estequiometría para IgG e IgE en los complejos anteriores es 1:1. Hasta el presente se desconoce la importancia de estas diferencias en los modos de unión.

Anticuerpos y receptor Fc neonatal

Un receptor Fc importante de la IgG es el receptor neonatal FcRn, que media el **transporte de IgG de la madre al feto** a través de la placenta (Figura 3.17). Este anticuerpo, que subsiste durante cierto tiempo en la sangre del recién nacido, se cree que es importante en la protección directa del niño a ciertos patógenos. Además, se ha propuesto que la presencia de anticuerpos maternos ayuda al desarrollo de la inmunidad celular en el lactante pequeño mediante la atenuación del patógeno más que por su inactivación completa. El FcRn también puede ser importante en el transporte de la IgG materna desde la leche hasta la sangre del lactante a través de sus células intestinales. De igual modo, el FcRn es fundamental para **mantener la larga vida media de la IgG en el suero** en adultos y niños. El receptor se une a la IgG en las vesículas ácidas (pH < 6,5) que protegen la molécula de la degradación y luego la liberan en el pH más elevado de la sangre (7,4).

Los estudios estructurales han revelado la base molecular para la actividad de FcRn. Este último es diferente de los receptores Fc de los leucocitos y, en cambio, tiene similitud estructural con las moléculas clase I del CMH. Es un heterodímero compuesto por una cadena β_2-microglobulina que tiene un enlace no covalente con una cadena unida a la membrana que abarca 3 dominios extracelulares. Uno de estos dominios, compuesto por una cadena de hidrato de carbono junto con β_2-microglobulina, interactúa con un sitio entre los dominios C_H2 y C_H3 de Fc (Figura 3.18). La interacción comprende 3 puentes salinos que se forman con los residuos de histidina (His) de la IgG, que con un pH < 6,5 presentan carga positiva. En un pH más elevado, los residuos His pierden sus cargas positivas, se debilita la interacción FcRn-IgG y la IgG se disocia.

IgA secretora

La IgA aparece selectivamente en secreciones seromucosas como saliva, lágrimas, secreciones nasales, sudor, calostro y leche, y secreciones pulmonares, de las vías genitourinarias y del tubo digestivo, donde es evidente que tiene por función defender las superficies externas expuestas del cuerpo contra el ataque de microorganismos. Ésta es una función importante ya que alrededor de 40 mg de IgA secretora por kilogramo de peso corporal son transportados cada día a través del epitelio de las criptas intestinales humanas hacia la superficie de las mucosas, en relación con una producción diaria total de IgG de 30 mg/kg.

La IgA es sintetizada localmente por los plasmocitos y se dimeriza en el interior de la célula junto con un polipéptido abundante en cisteína denominado cadena J, de peso molecular 15.000. La IgA dimérica se une con fuerza a un receptor para Ig polimérica (el **receptor poli-Ig, pIgR**, que también se une a la IgM polimérica) presente en la membrana de las células epiteliales de la mucosa. El complejo es luego endocitado de manera activa, transportado por el citoplasma y secretado en los líquidos corporales externos tras la escisión de la cadena peptídica pIgR. El fragmento del receptor que permanece unido a la IgA se denomina componente secretor y la molécula completa recibe el nombre de **IgA secretora** (Figura 3.19).

Isotipos, alotipos e idiotipos: variantes del anticuerpo

La variabilidad de anticuerpos suele dividirse por conveniencia en 3 tipos. Los **isotipos** son variantes presentes en todos los miembros sanos de una especie: las clases y las subclases de inmunoglobulinas son ejemplos de la variación isotópica vinculada con la región constante de la cadena pesada. Los **alotipos** son variantes que se heredan como alternativas (alelos) y, por consiguiente, no todos los miembros sanos de una especie heredan un alotipo particular. Los alotipos aparecen sobre todo como variantes génicas de la región constante de la cadena pesada, en el ser humano en las 4 subclases de IgG, la IgA2 y la IgM. La nomenclatura de los alotipos de las inmunoglobulinas humanas se basa en el isotipo en que se encuentra (p. ej., G1m define alotipos sobre una cadena pesada de IgG1, Km define alotipos en las

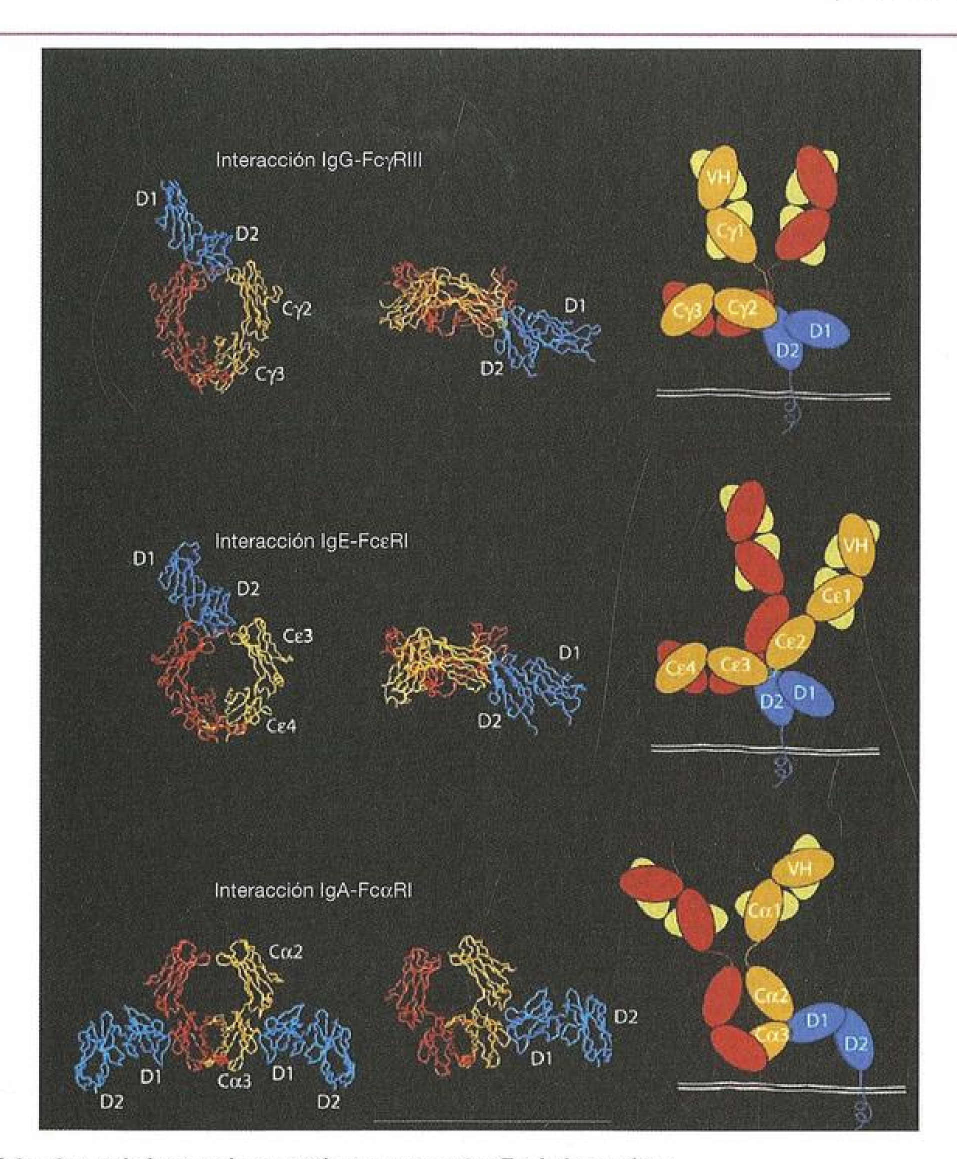


Figura 3.16. Estructuras de interacciones anticuerpo-receptor Fc de leucocitos.

Las columnas izquierda y media muestran imágenes de las estructuras obtenidas por cristalografía de los complejos de los receptores FcR con sus ligandos Fc respectivos. Los dominios extracelulares de los receptores se representan en azul, mientras que la cadena pesada de cada región Fc se muestra en rojo y la otra, en dorado. En la columna izquierda se observa cada región Fc enfrentada. La similitud entre la interacción IgG-FcγRIII e IgE-FcεRI es sorprendente, en tanto que la interacción de IgA-FcαRI difiere bastante en lo que se refiere a los sitios involucrados y la estequiometría. La columna media muestra una imagen en la que los dominios D2 de cada uno de los receptores se sitúan de modo que sus C-terminales miran hacia abajo. Aquí se ven las regiones Fc de la IgG y la IgE en una posición horizontal desde el costado. En la interacción de la IgA sólo se muestra una molécula del receptor. En la columna de la derecha aparece la representación esquemática de los receptores y sus ligandos intactos desde el mismo punto de vista que las imágenes de la columna media. Las cadenas ligeras se observan en amarillo. Es evidente la necesidad de desplazamiento de la IgG y la IgE para permitir que los extremos del Fab se ubiquen lejos de la superficie de la célula que contiene el receptor. (Gentileza de Jenny Woof).

cadenas ligeras κ), seguido por un sistema de numeración aprobado por la OMS.

La región variable de un anticuerpo puede actuar como un antígeno y los determinantes exclusivos de esta región que lo distingue de la mayoría de los otros anticuerpos de esa especie se conocen como sus determinantes idiotípicos. Por consiguiente, el **idiotipo** de un anticuerpo consiste en un conjunto de determinantes idiotípicos que individualmente se denominan idiótopos. Por lo general, los anticuerpos policlonales antiidiotípicos reconocen un conjunto de idiótopos, mientras que un anticuerpo monoclonal antiidiotipo reconoce un único idiótopo. Los idiotipos suelen ser específicos para un clon del anticuerpo (idiotipos privados), pero a veces son compartidos entre clones de anticuerpos diferentes (idiotipos públicos, recurrentes o de reacción cruzada). Un antiidiotipo puede reaccionar con determinantes distantes del sitio de unión con el antígeno, puede encajar en el sitio de unión y expresar la imagen del antígeno o

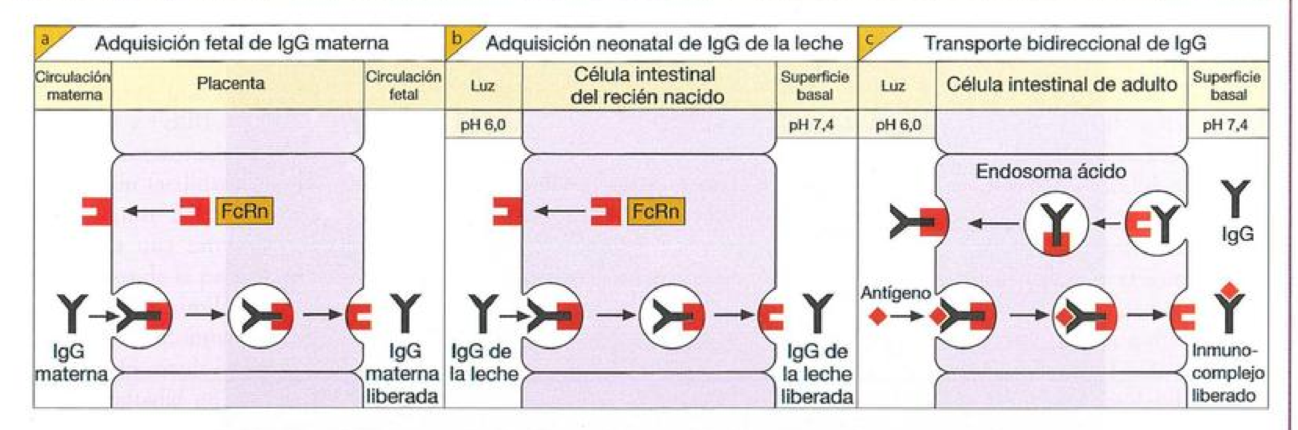


Figura 3.17. Función del receptor neonatal de IgG (FcRn) en las células epiteliales.

a) El receptor FcRn está presente en la placenta donde cumple la importante función de transferir la IgG materna a la circulación fetal. Esto proporciona protección antes de la generación de inmunocompetencia en el feto. Además, es evidente que cualquier agente infeccioso que pudiera alcanzar al feto *in utero* tiene que haber pasado primero por la madre, y el feto dependerá de que el sistema inmunitario de la madre haya producido IgG con especificidades de unión adecuadas. Esta IgG materna también protege al recién nacido debido a que es necesario que pasen algunas semanas después del nacimiento para que la IgG transferida sea catabolizada. b) Se ha demostrado claramente en roedores, aunque permanece en el plano de la especulación en los seres humanos, que hay transporte epitelial de IgG desde la leche materna a través de las células intestinales del recién nacido. La IgG se une al FcRn con un pH de 6, se incorpora la célula dentro de una vesícula recubierta por clatrina y se libera en el pH de la superficie basal. El movimiento direccional de IgG se logra por el efecto asimétrico del pH en la interacción Ig-receptor. Los ratones obtenidos por desactivación génica (*knockout*) carentes de FcRn no pueden adquirir la inmunoglobulina materna cuando son neonatos. Además, su IgG tiene una vida media mucho más corta, compatible con la función del FcRn como receptor protector que previene la degradación de la IgG y luego la recicla en la circulación. La semivida de la IgG es extraordinariamente prolongada cuando se la compara con la de la IgA y la IgM, y esto permite que la respuesta al antígeno se mantenga durante muchos meses tras la infección. c) Un papel adicional del FcRn puede ser como receptor versátil bidireccional. Después de la endocitosis puede producirse la unión de la IgG del lado no luminal de la célula epitelial, en el rango del pH más favorable de los endosomas ácidos. Así, este receptor puede proveer un mecanismo de vigilancia inmunitaria de la mucosa, al desplazarse de un lado al otro por la célula epitelial, aportar IgG a la luz intestinal y luego devolver los mismos anticuerpos en la forma de inmunocomplejos para la estimulación de las células B por las células foliculares dendríticas.

puede reaccionar con determinantes cerca del sitio de unión e interferir con la unión del antígeno. La secuenciación de un anticuerpo antiidiotípico generado contra un anticuerpo específico para el antígeno polipeptídico GAT en ratones reveló un CDR3 con una secuencia de aminoácidos idéntica a la del epítopo del antígeno, es decir, el antiidiotipo contiene una verdadera imagen del antígeno, pero esto es tal vez la excepción más que la regla.

Genética de la diversidad y la función del anticuerpo

Los genes de los anticuerpos son producidos por recombinación somática

El repertorio de inmunoglobulinas está codificado por múltiples segmentos génicos de la línea germinal que sufren diversificación somática en la célula B en desarrollo. Por lo tanto, aunque los componentes básicos necesarios para generar un repertorio de inmunoglobulinas se heredan, el repertorio maduro de anticuerpos de un individuo se forma en esencia durante su vida por alteración de los genes de la línea germinal heredados.

La primera evidencia de que los genes de las inmunoglobulinas se reordenan por **recombinación somática** fue publicada por Hozumi y Tonegawa en 1976 (Avances y descubrimientos 3.2). Dado que la recombinación somática implica el reordenamiento del DNA en las células somáticas, en contraposición con los gametocitos, los genes recién recombinados no se heredan. Como resultado, el repertorio primario de inmunoglobulinas diferirá levemente de un individuo al otro y se modificará más aún durante la vida de un individuo por su exposición a antígenos diferentes.

Segmentos génicos y locus variables de las inmunoglobulinas

Los locus de la región variable de las cadenas pesada y ligera en los seres humanos contienen múltiples segmentos génicos que se unen mediante recombinación somática para producir el exón de la región V final. La región variable de la cadena pesada humana está formada por la unión de 3

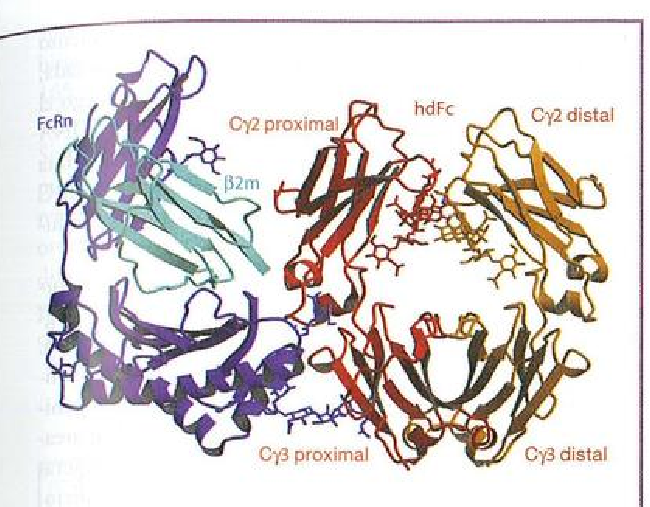


Figura 3.18. Estructura del receptor Fc neonatal de rata que se une al Fc de la IgG.

Se muestra un Fc heterodimérico (hdFc) con la cadena de unión al FcRn de color rojo y la cadena que no se une, de color anaranjado parduzco. Ésta ha sido mutada en varias posiciones para eliminar la unión al FcRn. Si se usa la molécula homodimérica normal, entonces se crean estructuras oligoméricas acintadas en las que los dímeros de FcRn están conectados por Fc, por lo tanto se evita la cristalización. En azul oscuro se muestran los tres dominios de FcRn (dos están próximos en la parte inferior del cuadro en esta imagen) y la β_2-microglobulina, en celeste. Una porción del dominio de α_2, un hidrato de carbono unido por N a este dominio y el C-terminal de la β_2-microglobulina constituyen el lado FcRn del sitio de interacción. Los residuos en el dominio C_H2/C_H3 establecen un punto de contacto del lado Fc del sitio de interacción. (De Martin W.L. et al. [2001] *Molecular Cell* 7, 867).

segmentos génicos, V (**variable**), D (**diversidad**) y J (**unión**), mientras que el gen variable de la cadena ligera se halla constituido por la unión de dos segmentos génicos, V y J. Como se ilustra en la Figura 3.20, hay múltiples segmentos V, D y J en los locus de las cadenas pesada y ligera.

Los genes de V_H humanos fueron mapeados en el cromosoma 14, aunque también se identificaron genes de IgH huérfanos en los cromosomas 15 y 16. El locus V_H humano es extremadamente polimorfo y puede haber evolucionado a través de la duplicación repetida, la deleción y la recombinación del DNA. Los polimorfismos encontrados dentro del repertorio de la línea germinal se deben a la inserción o la deleción de segmentos génicos, o a la aparición de alelos diferentes del mismo segmento. En los locus de inmunoglobulinas también están presentes varios seudogenes, que varían desde los más conservados, que contienen escasas mutaciones por sustitución de base (o puntuales), hasta aquellos que son más divergentes con mutaciones extensas. Hay alrededor de cien genes de V_H humanos que pueden agruparse en 7 familias sobre la base de la homología de secuencia, y estas familias se pueden reunir, además, en 3 clanes. Los miembros de una familia dada muestran una homología de secuencia en el nivel del nucleótido de alrededor del 80%. El repertorio de la cadena pesada funcional está formado por 50 genes de V_H funcionales, 27 genes D_H y 6 genes J_H. El locus lambda humano se localiza en el cromosoma 22 y tiene alrededor de 33-36 genes V_λ funcionales y 5 segmentos génicos J_λ funcionales. Los genes V_λ pueden agruparse en 10 familias que se dividen, además, en 7 clanes. El locus kappa humano en el cromosoma 2 está compuesto por un total de 34 a 40 genes V_λ funcionales y 5 genes J_λ funcionales. Sin embargo, el locus kappa contiene una duplicación

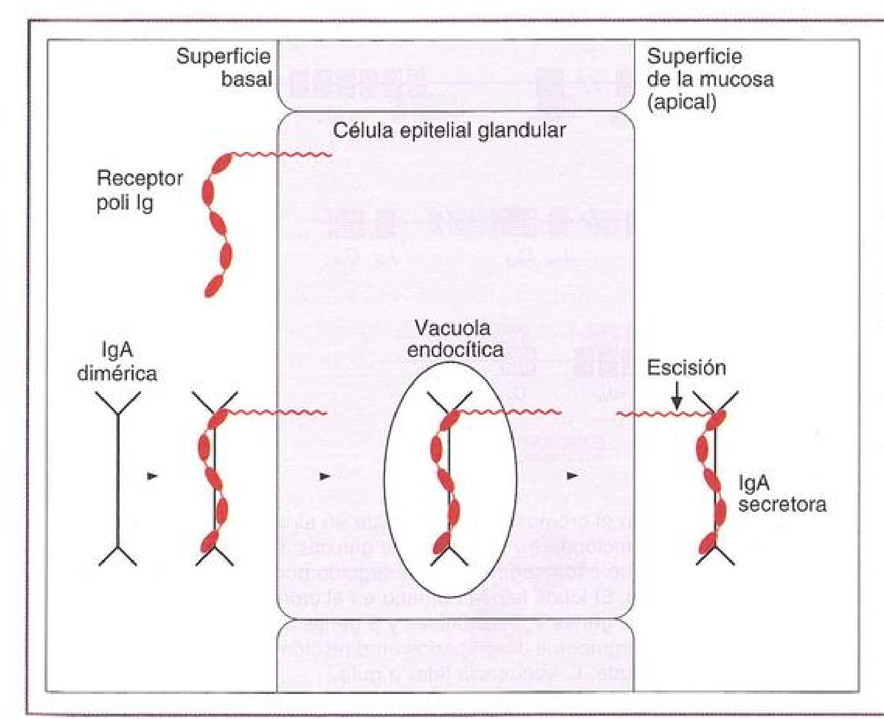


Figura 3.19. Secreción de IgA en la superficie de la mucosa.

La célula de la mucosa sintetiza un receptor para Ig polimérica (pIgR) que se inserta en la membrana basal. La IgA dimérica se une a este receptor y es transportada por medio de una vacuola endocítica a la superficie apical. La escisión del receptor libera la IgA secretoria aún fijada a parte de éste, denominado componente secretor. Obsérvese el modo en que el desdoblamiento del receptor introduce una asimetría que dirige el transporte de dímeros de IgA a la superficie de la mucosa (en dirección opuesta a la transcitosis de la IgG de la leche en la Figura 3.17).

grande de la mayor parte de los genes V_κ, y la mayoría de los genes V_κ en el grupo distal, aunque funcionales, rara vez se usan.

Los locus de inmunoglobulinas también contienen elementos reguladores (Figura 3.21), como un motivo octamérico conservado y la caja TATA en las regiones del promotor. Las secuencias guía también se encuentran en el extremo 5' de los segmentos variables, y los elementos potenciadores también están presentes dentro de los loci para facilitar la transcripción productiva.

Recombinación V(D)J y diversidad combinatoria

La unión de estos segmentos génicos, ilustrada en la Figura 3.22, se conoce como **recombinación V(D)J** y es un proceso finamente regulado y ordenado. El exón de la cadena ligera se forma a partir de la unión simple del segmento génico V a J. Sin embargo, en el locus de la cadena pesada, se une primero un segmento D a un segmento J y luego el segmento V se une a la secuencia DJ combinada. El DNA reordenado se transcribe, el RNA transcrito se empalma para reunir el exón de la región V y el exón de la región C y, por último, el mRNA empalmado se traduce para producir la proteína inmunoglobulina final.

Muchos genes especiales de inmunoglobulina pueden formarse por unión de combinaciones diferentes de los segmentos V, D y J en los locus de las cadenas pesada y ligera. La creación de diversidad en el repertorio de inmunoglobulinas por medio de esta unión de diversos segmentos génicos se conoce como **diversidad combinatoria.** El apareamiento de cadenas pesadas distintas con cadenas ligeras diferentes lambda o kappa da lugar a una diversidad adicional. Por ejemplo, el repertorio posible de la cadena pesada es

Avances y descubrimientos 3.2—El Premio Nobel en Fisiología o Medicina de 1987

Susumu Tonegawa fue galardonado en 1987 con el Premio Nobel en Fisiología o Medicina por "su descubrimiento del principio genético para la generación de la diversidad de anticuerpos". En su trabajo de 1976, Tonegawa utilizó el análisis de inmunotransferencia de Southern del DNA digerido por la enzima de restricción de células linfoides y no linfoides para mostrar que los genes variables y constantes de las inmunoglobulinas están distantes entre sí en el genoma de la línea germinal. El DNA embrionario mostró dos componentes cuando se hibridó con sondas específicas de RNA para: a) ambas regiones, variable y constante, y b) la región constante únicamente; mientras que ambas sondas se localizaron en una banda sola cuando se hibridó al DNA proveniente de una célula de plasmacitoma productor de anticuerpo. Este autor propuso que los patrones de hibridación diferencial podrían explicarse si los genes variables y constantes estuvieran distantes entre sí en el DNA de la línea germinal, pero se reunían para codificar el gen completo de la inmunoglobulina durante la diferenciación del linfocito.

IgH, cromosoma 14:

L_1 V_{H1} L_2 V_{H2} ~L_{40} ~V_{H40} D_{H1} D_{H2} D_{H27} J_{H1}-J_{H6} C_μ

Igλ, cromosoma 22:

L_1 $V_{\lambda 1}$ L_2 $V_{\lambda 2}$ ~L_{30} ~$V_{\lambda 30}$ $J_{\lambda 1}$ $C_{\lambda 1}$ $J_{\lambda 4}$ $C_{\lambda 4}$ $J_{\lambda 5}$ $C_{\lambda 5}$

Igκ, cromosoma 2:

L_1 $V_{\kappa 1}$ L_2 $V_{\kappa 2}$ ~L_{40} ~$V_{\kappa 40}$ $J_{\kappa 1}$-$J_{\kappa 5}$ C_κ

Figura 3.20. Loci de inmunoglobulinas humanas.

Se muestran esquemas de los loci de la cadena pesada (parte superior) y de la cadenas ligeras lambda (parte media) y kappa (parte inferior) humanas. El locus de la cadena pesada humana en el cromosoma 14 consta de alrededor de 38-46 genes V_H funcionales, 27 genes D_H y 6 genes J_H, que están organizados en grupos hacia el extremo 5' de las regiones constantes. El locus lambda humano en el cromosoma 22 consiste en alrededor de 30 genes V_λ funcionales y 5 segmentos génicos J_λ funcionales, en los que cada segmento J es seguido por un segmento constante. El locus kappa humano en el cromosoma 2 consta de 34-40 genes V_κ funcionales y 5 genes J_κ funcionales, con los segmentos J agrupados en dirección 5' de la región constante. L, secuencia líder o guía.

aproximadamente 50 $V_H \times 27 D_H \times 6 J_H = 8{,}1 \times 10^3$ combinaciones diferentes. De manera similar, hay alrededor de 165 ($33 V_\lambda \times 5 J_\kappa$) y 200 ($40 V_\kappa \times 5 J_\kappa$) combinaciones distintas para un total de 365 combinaciones de cadena ligera. Si se considera la posibilidad de que cada cadena pesada pueda aparearse con cada cadena ligera, la diversidad del repertorio de inmunoglobulina es bastante grande, en el orden de 3.10^6 combinaciones posibles. También se genera diversidad durante la recombinación de segmentos génicos y por hipermutación somática, como se explicará en las secciones siguientes. De esta manera, aunque el número de segmentos génicos de la línea germinal parece limitado en tamaño, puede originarse un repertorio de inmunoglobulinas increíblemente diverso.

Secuencias señales de recombinación

La **secuencia señal de recombinación** (RSS, *recombination signal sequence*) ayuda a guiar la recombinación entre segmentos génicos apropiados. La RSS (Figura 3.23) es una secuencia no codificante que flanquea los segmentos génicos codificantes. Está formada por secuencias conservadas de un

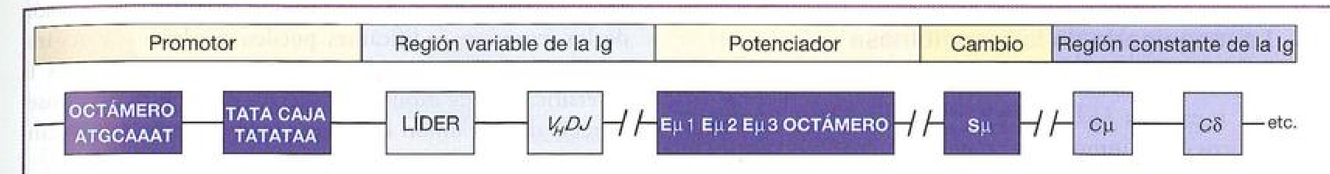


Figura 3.21 Elementos reguladores de los loci de inmunoglobulinas.

Cada segmento *VDJ* que codifica la región variable se asocia con una secuencia líder. Muy próximo al extremo 5' se halla la caja TATA del promotor, que se une a la RNA polimerasa II, y el motivo octamérico, que es una de las varias secuencias cortas que se unen a los factores de transcripción reguladores de la operación. Los promotores de la *región V* son relativamente inactivos y sólo en asociación con los potenciadores, que también están compuestos por motivos de secuencia cortos capaces de unirse a las proteínas nucleares, aumentan la velocidad de la transcripción hasta los niveles típicos de las células B con secreción activa. Los potenciadores están cerca de las regiones que controlan el cambio de la región constante de una inmunoglobulina a otra, por ejemplo, IgM a IgG (figura 3.27). Los transcritos primarios se inician 20 nucleótidos hacia el extremo 3' de la caja TATA y se extienden más allá del fin de la región constante. Éstos sufren corte y empalme, y son escindidos en el extremo 3' y poliadenilados para generar el mRNA capaz de ser traducido.

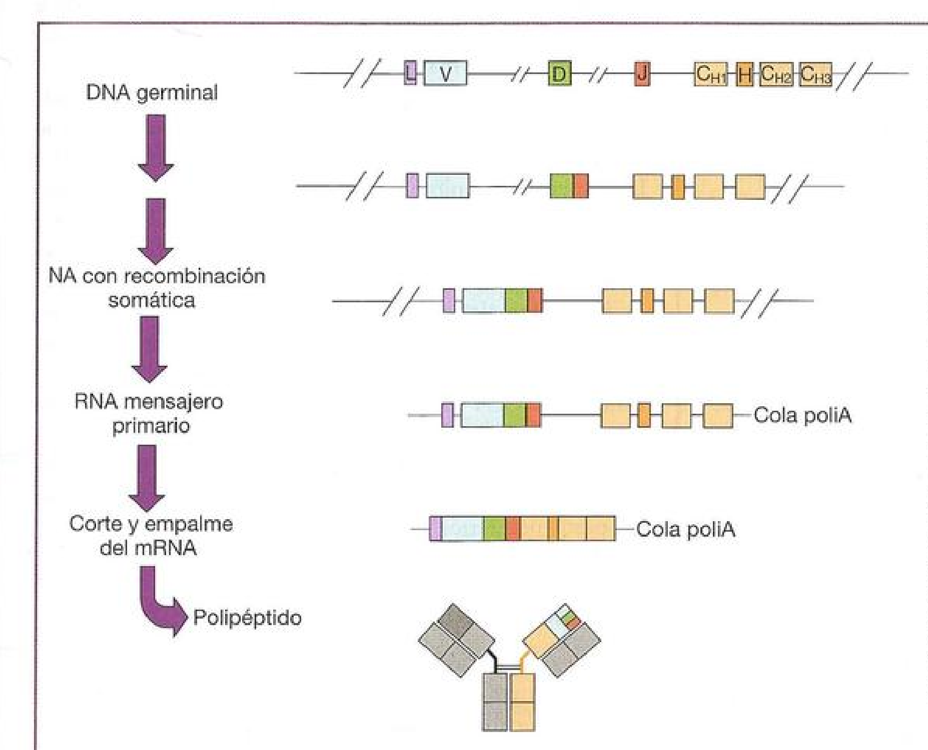


Figura 3.22. Esquema general de la recombinación de V(D)J.

Los segmentos génicos de diversidad (D) y unión (J) en el DNA de la línea germinal se unen a través de la recombinación somática en el locus de la cadena pesada. El segmento génico variable (V) se une luego al gen D-J recombinado para producir el exón de la cadena pesada totalmente recombinado. En los loci de la cadena ligera, la recombinación somática tiene lugar sólo con los segmentos V y J. El DNA recombinado se transcribe; el transcrito primario RNA sufre luego un proceso de corte y empalme, y reúne las regiones variables y constantes. La molécula del mRNA empalmada se traduce para producir la proteína inmunoglobulina. Se ilustra la contribución de los diferentes segmentos génicos a la secuencia del polipéptido para una de las cadenas pesadas. H, bisagra.

heptámero y secuencias de un nonámero separadas por un espaciador no conservado de 12 o 23 nucleótidos. La recombinación eficaz se produce entre los segmentos con un espaciador de 12 nucleótidos y un espaciador de 23 nucleótidos. Esta **regla "12/23"** contribuye a asegurar que se unan los segmentos génicos adecuados.

En el locus V_H, los segmentos V y J están flanqueados por RSS con un espaciador de 23 nucleótidos, mientras que los segmentos D lo están por RSS con un espaciador de 12 nucleótidos. En los locus de la cadena ligera, los segmentos de V_κ están flanqueados por RSS con espaciadores de 12 nucleótidos y los segmentos J_κ están flanqueados por RSS con espaciadores de 23 nucleótidos, ordenamiento que se invierte en el locus lambda.

La maquinaria de la recombinasa

La V(D)J recombinasa es un complejo de enzimas que llevan a cabo la recombinación somática de los segmentos génicos de las inmunoglobulinas (Figura 3.24). Los productos de los genes 1 y 2 activadores de la recombinación, RAG-1 y RAG-2, son enzimas específicas de linfocitos esenciales para la recombinación V(D)J. En los primeros pasos de la recombinación V(D)J, el complejo RAG se une a las secuencias señales de recombinación, y junto con el grupo de proteínas de alta movilidad (HMG, *high mobility group*) que participan en la incurvación del DNA, se aproximan las dos secuencias señales de recombinación. Al contrario de lo que sucede con las enzimas RAG específicas de linfocitos, las proteínas HMG se expresan de manera ubicua.

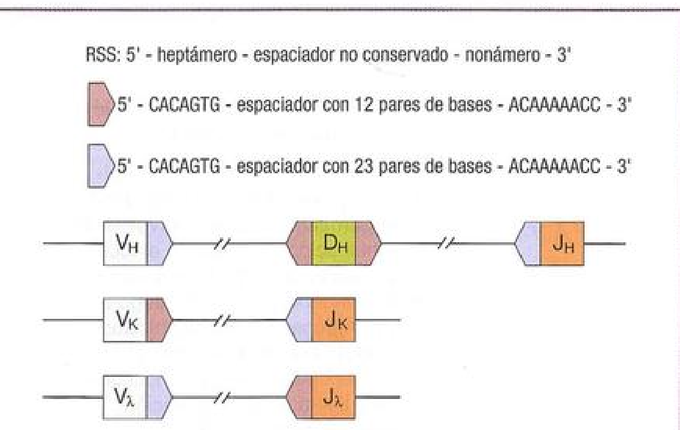


Figura 3.23. Secuencia señal de recombinación.

La secuencia señal de recombinación (RSS) está formada por secuencias conservadas de un heptámero y un nonámero, entre los que se intercala un espaciador de 12 o 23 nucleótidos no conservados. La recombinación eficaz se produce entre segmentos con un espaciador de 12 nucleótidos y un espaciador de 23 nucleótidos. Las RSS con espaciadores de 23 nucleótidos flanquean lo segmentos V y J en el locus de la cadena pesada, los segmentos J del locus kappa y los segmentos V del locus lambda, mientras que las RSS con espaciadores de 12 nucleótidos flanquean los segmentos D del locus de la cadena pesada, los segmentos V del locus kappa y los segmentos J del locus lambda.

A continuación, se introduce una mella de cadena simple entre el extremo heptamérico 5' de la secuencia señal de recombinación y el segmento codificante. Esta mella produce un grupo OH 3' libre que ataca la cadena de DNA antiparalela contraria en una reacción de transesterificación. Este ataque da lugar a una ruptura de la cadena doble de DNA que lleva a la formación de horquillas cerradas de modo covalente en los dos extremos codificantes, y a la formación de extremos de señal romos. En esta fase se forma un complejo posterior a la escisión en el que la recombinasa RAG permanece asociada con los extremos del DNA.

Por último, la ruptura de DNA es reparada por la maquinaria de unión de extremos no homólogos. Las secuencias señales de recombinación se unen precisamente para generar la señal de unión. Por el contrario, durante la reparación de los extremos codificantes pueden perderse o agregarse nucleótidos (Figura 3.25). La **diversidad de unión** es la diversificación de exones de la región variable como consecuencia de esta unión imprecisa de los extremos codificantes.

Primero, un número pequeño de nucleótidos es a menudo eliminado del extremo codificante por acción de una exonucleasa desconocida. Asimismo, la diversidad de unión implica el posible agregado de dos tipos de nucleótidos, **nucleótidos N** y **nucleótidos P.** Las secuencias palindrómicas que resultan de la escisión asimétrica y el rellenado de las horquillas codificantes con secuencias no codificantes se mencionan como nucleótidos P. Los nucleótidos N se forman por la adición de nucleótidos no codificantes a los extremos codificantes, mediada por la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). Aunque los nucleótidos N y P, y la deleción del extremo y los nucleótidos codificantes sirven para diversificar en gran medida el repertorio de inmunoglobulinas, la incorporación de estos nucleótidos también puede originar la aparición de genes de receptores que producen un marco de lectura inadecuado.

Al igual que el complejo de recombinasa RAG, la **maquinaria de reparación del DNA** funciona como un complejo proteico. Sin embargo, a diferencia de la recombinasa RAG, las proteínas de unión de extremos no homólogos se expresan de manera ubicua. En los primeros pasos de la reparación del DNA, las proteínas Ku70 y Ku80 forman un heterodímero que une los extremos rotos del DNA. El complejo Ku recluta la subunidad catalítica de la proteincinasa dependiente del DNA, DNA-PKcs, una proteincinasa serina-treonina. Después, la PKcs activada por DNA recluta y fosforila XRCC4 y Artemis. Esta última es una endonucleasa que abre los extremos codificantes de la horquilla. Por último, la DNA ligasa IV une XRCC4 para formar un complejo de ligación terminal, que media la ligación final y rellena los pasos necesarios para formar las uniones codificantes y señal.

Regulación de la recombinación V(D)J

La recombinación V(D)J y la maquinaria de la recombinasa deben ser reguladas cuidadosamente para evitar estragos en el genoma celular. Por ejemplo, la recombinación V(D)J aberrante está vinculada con ciertos linfomas de células B. La recombinación V(D)J es regulada en gran medida

V
J
Unión y sinapsis del complejo RAG (proteínas RAG-1, RAG-2 y HMG)
La cadena doble de DNA se curva para aproximar las dos secuencias señal de recombinación
RSS
Formación de la muesca
HO
HO
Complejo RAG
Formación de la horquilla (mostrada en rojo) (reacción de transesterificación)
Complejo posterior a la escisión
Apertura y escisión de la horquilla (maquinaria NHEJ)
Unión codificante
Unión señal

Figura 3.24. V(D)J recombinasa.

En los pasos iniciales de la recombinación de V(D)J, las proteínas RAG-1 y RAG-2 se asocian con las secuencias señales de recombinación. Una muesca de cadena simple se introduce luego entre el extremo heptamérico 5' de la secuencia señal de recombinación y el segmento codificante, lo cual da lugar a un grupo libre OH3' que media una reacción de transesterificación. Esta reacción conduce a la formación de horquillas de DNA en los extremos codificantes. La escisión de la horquilla y la resolución del complejo posterior a la escisión por proteínas de unión de extremos no homólogas (NHEJ) da por resultado la formación de uniones codificantes y de señal separadas en los pasos finales de la recombinación V(D)J.

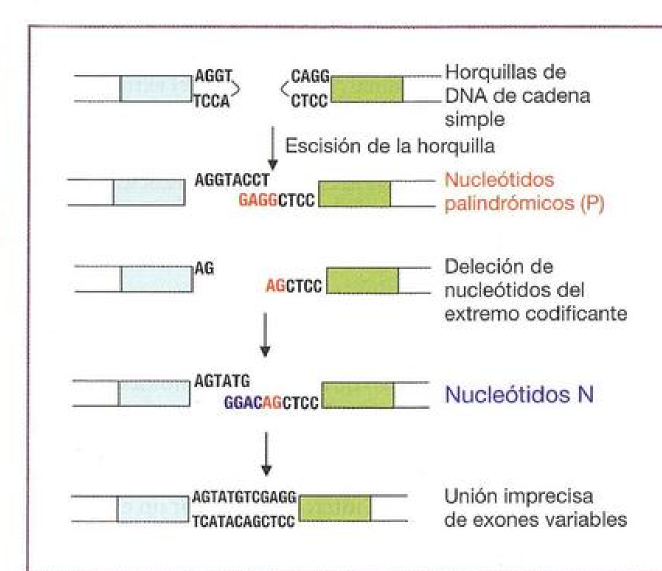


Figura 3.25. La diversidad de unión establece aún más variación en el repertorio inmunitario.

El repertorio de inmunoglobulinas se diversifica aún más durante la escisión y la resolución de las horquillas con extremos codificantes mediante la deleción de un número variable de nucleótidos del extremo codificante, el agregado de nucleótidos N por la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), y nucleótidos palindrómicos (P) que surgen debido al rellenado mediado por el molde de las horquillas codificantes escindidas de manera asimétrica. TdT agrega nucleótidos al azar a los extremos del DNA (nucleótidos N), y los extremos de cadena simple se aparean, posiblemente aunque no siempre, a través de nucleótidos complementarios (TG en la cadena superior y CA en la cadena inferior). El corte por la exonucleasa para eliminar los nucleótidos no apareados y la maquinaria de reparación del DNA actúan para reparar la unión del DNA.

por el control de la expresión de la maquinaria de recombinación, y el acceso de segmentos génicos y potenciadores y promotores cercanos. Como ya mencionamos, la actividad RAG-1 y RAG-2 es específica para las células linfoides, y un control adicional es impuesto por la regulación negativa de la actividad RAG durante las fases apropiadas de desarrollo de la célula B. El acceso diferencial de segmentos génicos a la maquinaria de la recombinasa, que puede lograrse alterando la estructura de la cromatina, también contribuye a asegurar que se recombinen los segmentos génicos apropiados en un orden adecuado. Los elementos de control transcripcional con acción en *cis*, como los potenciadores y los promotores, ayudan asimismo a regular la recombinación. Aunque no es una regla rígida e inalterable, la transcripción de ciertos elementos reguladores parece relacionarse con el reordenamiento de los genes adyacentes. Esta **transcripción estéril**, o improductiva, puede cooperar de algún modo a dirigir las proteínas requeridas o a modular las posibilidades de acceso del gen. Por último, además de dirigir la recombinación entre el segmento génico apropiado, las secuencias precisas del RSS en sí, y las secuencias de los segmentos génicos, pueden influir en la eficacia de la reacción de recombinación.

Hipermutación somática

Tras la activación por el antígeno, las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas son diversificadas aún más por **hipermutación somática**. Este proceso implica la introducción de mutaciones por sustitución de bases (o puntuales) codificantes en las regiones V de las células B con proliferación rápida en los centros germinativos de los folículos linfoides. La hipermutación somática dirigida por el antígeno de los genes variables de las inmunoglobulinas puede producir un aumento en la afinidad de unión del receptor de la célula B por su ligando cognado. Como las células B con inmunoglobulinas de mayor afinidad pueden competir con mayor eficacia por las cantidades limitadas de antígeno presente; se observa un aumento en la afinidad promedio de los anticuerpos producidos durante una respuesta inmunitaria. Este aumento en la afinidad promedio de las inmunoglobulinas se conoce como **maduración de la afinidad**.

La hipermutación somática se produce con una tasa elevada, estimada en 1×10^{-3} mutaciones por par de bases por generación, que es alrededor de 10^6 veces superior a la tasa de mutación de los genes de mantenimiento (*housekeeping genes*) celulares. Hay un sesgo para las mutaciones de transición, y los "puntos calientes de mutación" en las regiones variables mapean para los motivos RGWY (R = purina; Y = pirimidina, W = A o T). Aún no se conocen con claridad y son tema de investigaciones actuales los mecanismos exactos por los que se introducen mutaciones y se dirigen de preferencia a las regiones V apropiadas, mientras las regiones constantes de los locus de inmunoglobulinas permanecen protegidos. Para que tenga lugar la hipermutación somática parece requerirse, pero no es necesariamente suficiente, la transcripción a través de la región V diana. Además, se ha demostrado que la enzima **citidina desaminasa inducida por activación** (AID; *activation-induced cytidine deaminase*) es esencial tanto para la hipermutación somática como para la recombinación con cambio de clase.

La AID es un citidina desaminasa capaz de llevar a cabo la desaminación dirigida de C a U y muestra una fuerte homología con la enzima de edición del RNA APOBEC-1. Se han propuesto dos hipótesis actuales para explicar el mecanismo por el cual actúa AID: una considera que favorece la edición del RNA y la otra, que propicia la desaminación del DNA. Es posible que la AID reconozca y actúe sobre un mRNA precursor, o más probablemente que la AID desamine de manera directa el DNA para producir errores de apareamiento U:G. En la actualidad se está estudiando el mecanismo exacto por el cual la AID puede regular de modo diferencial la hipermutación somática y la recombinación para el cambio de clase, y puede depender de interacciones de cofactores particulares con dominios específicos de AID.

Por consiguiente, la diversidad dentro del repertorio de inmunoglobulinas se genera por: a) unión combinatoria de segmentos génicos, b) diversidad de unión, c) apareamiento combinatorio de cadenas pesadas y ligeras, y d) hipermutación somática de las regiones V.

Conversión génica y diversificación del repertorio

Aunque los ratones y los seres humanos usan la diversidad combinatoria y de unión como mecanismo para generar un repertorio diverso, en muchas especies, como las aves, los bovinos, los porcinos, los ovinos, los equinos y los conejos, la recombinación V(D)J produce el ensamble y la expresión de un único gen funcional. La diversificación del repertorio se logra entonces por **conversión génica**, proceso en el que se utilizan seudogenes V como moldes para ser copiados en el exón ensamblado de la región variable. Una diversificación adicional puede lograrse por hipermutación somática.

El proceso de conversión génica se identificó en un comienzo en pollos, en los que las células B inmaduras tienen el mismo exón de la región variable. Durante el desarrollo de la célula B en la bolsa de Fabricio, las células B en rápida proliferación sufren conversión génica para diversificar el repertorio de inmunoglobulinas (Figura 3.26). Las extensiones de secuencias desde los seudogenes de la región variable de la línea germinal, localizados en el extremo 5' de los genes V funcionales, se introducen en las regiones V_L y V_H. Este proceso tiene lugar en las placas de Peyer del íleon de bovinos, porcinos y equinos, y en el apéndice de conejos. Estos tejidos linfoides asociados con el intestino son el equivalente mamífero de la bolsa de Fabricio en esas especies.

Recombinación para el cambio de clase

La IgM estimulada por antígeno que expresan las células B en el centro germinativo de los órganos linfoides secundarios, como el bazo y los ganglios linfáticos, sufre la **recombinación de cambio de clase** (CSR, *class switch recombination*). Ésta permite que el exón de la región constante IgH de un anticuerpo dado sea intercambiado por un exón alternativo, lo cual da lugar a la expresión de anticuerpos con la misma especificidad para el antígeno pero de diferentes iso-

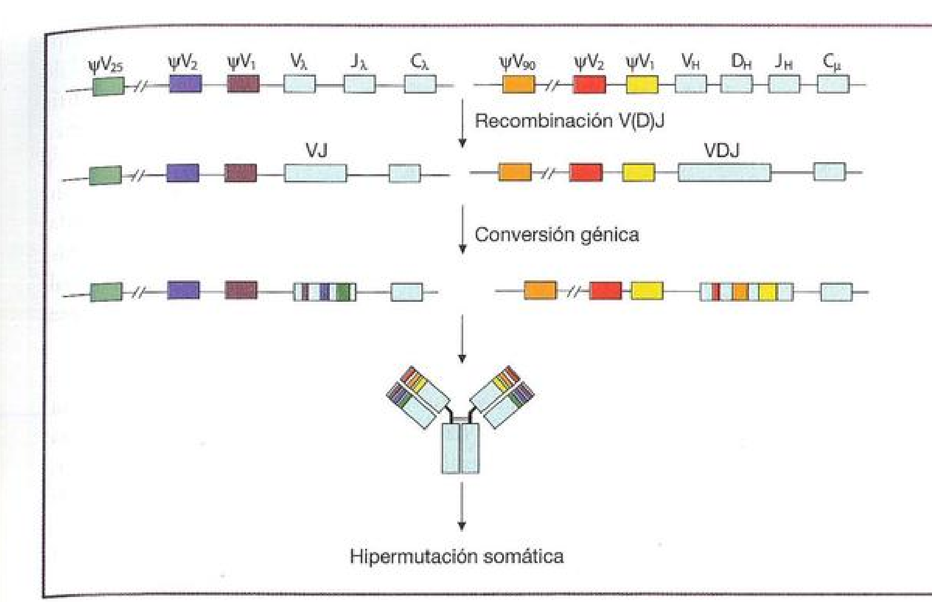


Figura 3.26. Diversificación de inmunoglobulina por medio de la conversión génica.

La recombinación V(D)J en células B de pollo produce el ensamble de un único exón de la región variable. En el proceso de conversión génica, las secuencias de seudogenes situados hacia el extremo 5' de los segmentos génicos funcionales se copian en los exones variables recombinados en los loci de las cadenas ligera y pesada en las células B en rápida proliferación en la bolsa de Fabricio. Esto determina un repertorio diversificado de anticuerpos.

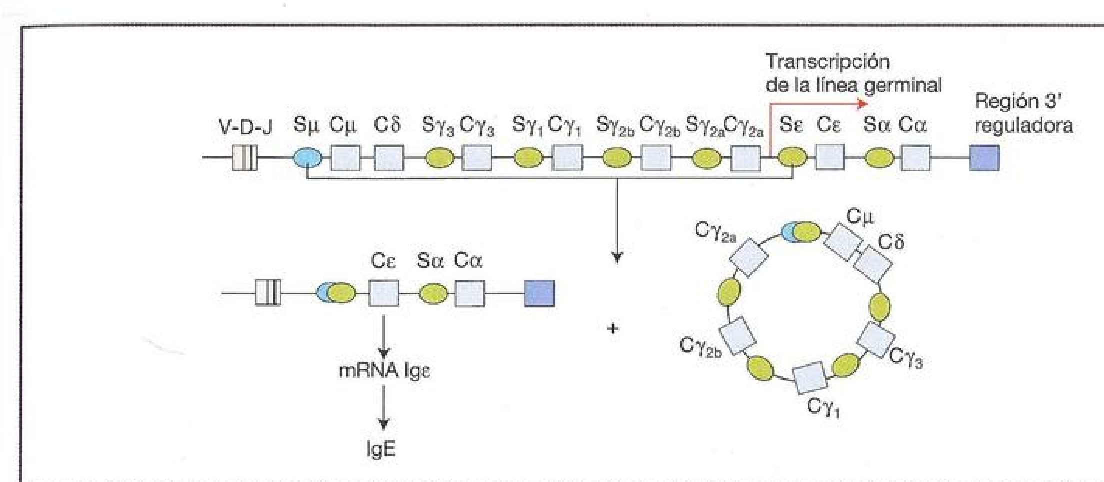


Figura 3.27. La recombinación de cambio de clase permite la expresión de diferentes isotipos del anticuerpo.

La recombinación de cambio de clase implica la recombinación de DNA en secuencias repetitivas denominadas regiones "interruptoras" (*switch* o S), y se ilustra aquí para un cambio de IgM a IgE en el locus de la cadena pesada del ratón. El cambio a un isotipo IgE comienza con la transcripción de la línea germinal desde el promotor hacia el extremo 5' del exón de la región constante y la recombinación entre las regiones Sμ y Sε. Esta reacción de recombinación del DNA lleva el exón de la región constante de la IgE hacia el extremo 3' del exón de la región variable. Los exones de las otras regiones S y de la región constante se eliminan y forman un círculo episómico. La transcripción del DNA reordenado produce mRNA de IgE, que puede ser traducido para dar lugar a la proteína IgE.

tipos y, por lo tanto, con funciones efectoras distintas, como se describió antes. La CSR se produce a través de una recombinación por deleción del DNA en el locus IgH (Figura 3.27), que se ha estudiado en profundidad en ratones. Los exones de la región constante para los isotipos IgG, IgA e IgE se localizan en el extremo 3' del exón de la IgM (Cμ), y la CSR se produce entre **regiones de cambio** (*switch*) o **regiones S**. Las regiones S son secuencias repetidas, a menudo con alto contenido de G sobre la cadena codificante, que se encuentran en el extremo 5' de cada exón de CH. Son introducidas rupturas en el DNA de dos regiones S y la fusión de las regiones S conduce al reordenamiento del locus C_H, en el que el exón variable se une a un exón para una nueva región constante. El DNA entre las dos regiones S se escinde y forma un círculo episómico. Por último, el corte y empalme alternativo del transcrito primario de RNA generado a partir del DNA reordenado da lugar a formas de inmunoglobulina unidas a la membrana o secretadas.

Antes de la recombinación entre regiones S, la transcripción se inicia desde un promotor situado en el extremo 5' de un exón que precede todos los genes C_H capaz de sufrir CSR, el exón intercalado (I). Estos transcritos de la línea germinal comprenden los exones de las regiones I, S y C, y no parecen codificar ninguna proteína funcional. Sin embargo, la transcripción de la línea germinal es requerida, aunque no es suficiente, para estimular la CSR. El mecanismo preciso que determina la CSR es tema de estudio actual, pero las investigaciones indican que la AID, descrita antes como envuelta en la hipermutación somática, contribuye a mediar la CSR, junto con algunos componentes de la vía de unión terminal no homóloga y varias otras vías de reparación del DNA. La unión de las regiones S puede estar mediada por la asociación con los promotores de la transcripción, los potenciadores, los factores de la cromatina, las proteínas de reparación del DNA y los factores asociados a la AID, o por interacciones que involucran las secuencias de la región S en sí misma.

RESUMEN

Estructura y función del anticuerpo

- Los anticuerpos reconocen el material extraño y activan su eliminación.
- Son moléculas con forma de Y o de T en las que los brazos (Fab) reconocen el material extraño, y el tallo (Fc) interactúa con moléculas del sistema inmunitario que conducen a la eliminación del material extraño unido al anticuerpo.
- Los anticuerpos se basan en una estructura de 4 cadenas compuestas por dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas.
- Las porciones N-terminal de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras forman dos brazos Fab idénticos que están unidos al tallo Fc de la molécula, compuesto por las porciones C-terminal de las cadenas pesadas.
- Los extremos de los brazos Fab consisten en regiones de secuencias de aminoácidos variables que intervienen en la unión con el antígeno y por eso determinan la especificidad de cada anticuerpo. El repertorio de anticuerpos humanos es inmenso, lo cual permite el reconocimiento de casi cualquier forma molecular.
- El tallo Fc de la molécula tiene una secuencia más conservada y está ligado a la unión de moléculas efectoras, como complemento y receptores Fc.
- Las diferencias en las regiones Fc conducen a clases y subclases distintas de anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig).
- Hay 5 clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, que cumplen funciones diferentes en la protección inmunitaria. También tienen estados de polimerización diversos.
- La estructura de los anticuerpos está organizada en dominios basados en una disposición en hoja β denominada pliegue de la inmunoglobulina.
- En la IgG, los brazos Fab, compuestos por dos dominios variables y dos dominios constantes, se unen por medio de una región bisagra flexible al Fc, formado por 4 dominios constantes.
- La flexibilidad es una característica importante de la estructura del anticuerpo que permite la interacción con los antígenos y las moléculas efectoras en una diversidad de ambientes.

Interacción del anticuerpo con las moléculas efectoras

- La IgG activa el complemento mediante la fijación de C1q cuando se agrupa sobre un antígeno como un patógeno. La IgM es multivalente pero, al unirse con el antígeno, sufre un cambio estructural para fijar C1q.
- Se han descrito los receptores de leucocitos para IgG, IgA e IgE que, cuando se unen al anticuerpo asociado con el antígeno, activan mecanismos efectores como la fagocitosis, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo y las respuestas inflamatorias agudas. La interacción entre el anticuerpo y los receptores Fc también puede ser inmunorreguladora.
- Las estructuras de los receptores Fc para IgG y el receptor Fc para IgE de los mastocitos, y el modo de interacción de los receptores con la inmunoglobulina, parecen ser bastante similares. Sin embargo, el receptor para IgA tiene una estructura y un modo de interacción con la IgA bien diferenciados.
- La IgG interactúa con el receptor neonatal FcRn para promover el transporte de IgG de la madre al feto y mantener su vida media prolongada en el suero.

Características de las clases de inmunoglobulinas

- La IgG es monomérica y constituye el principal anticuerpo en el suero y los tejidos no mucosos, donde inactiva a los patógenos directamente y por medio de la interacción con moléculas activadoras, como complemento y receptores Fc.
- La IgA se halla sobre todo como monómero en el plasma, pero en las secreciones seromucosas, donde es la prin-

cipal inmunoglobulina vinculada con la defensa de las superficies externas del cuerpo; está presente como un dímero unido a un componente secretor.

- La IgM se presenta con más frecuencia como una molécula pentamérica, aunque una fracción menor es hexamérica. Es fundamentalmente intravascular y se forma en una fase temprana en la respuesta inmunitaria. Debido a su valencia elevada, es un aglutinador bacteriano muy eficaz y mediador de la citólisis dependiente del complemento; por lo tanto constituye una poderosa defensa de primera línea contra la bacteriemia.
- La IgD está presente sobre todo en los linfocitos y actúa, junto con la IgM, como receptor antigénico en las células B vírgenes.
- La IgE se fija muy fuertemente a los mastocitos y el contacto con el antígeno conduce al reclutamiento local de agentes antimicrobianos a través de la desgranulación de los mastocitos y la liberación de mediadores inflamatorios. La IgE es de importancia en ciertas infecciones parasitarias y determina los síntomas de la alergia atópica.

La generación de la diversidad de anticuerpos

- El repertorio de anticuerpos de un individuo es generado a través de la recombinación somática de un conjunto limitado de segmentos génicos de la línea germinal.
- La región variable de la cadena pesada humana se forma por la unión de los segmentos génicos V_H, D y J, y las regiones variables de la cadena ligera (κ y λ), por la unión de los segmentos V_L y J. La unión es imprecisa, lo cual conduce a la generación de diversidad adicional.
- La diversificación es aún mayor por la mutación somática dirigida a las regiones variables. La mutación somática y la selección permiten la maduración de la afinidad de los anticuerpos.
- Algunas especies utilizan la conversión génica en lugar de la diversidad combinatoria y de unión para lograr la diversificación de anticuerpos.
- La recombinación para cambio de clase permite que la misma especificidad de anticuerpo (regiones variables) se asocie con diferentes clases y subclases de anticuerpos (regiones constantes) y, por ende, con funciones diferentes.

LECTURAS ADICIONALES

Arakawa H. & Buerstedde J. (2004) Immunoglobulin gene conversion: insights from bursal B cells and the DT40 cell line. Developmental Dynamics 229, 458–464.

Carroll M.C. (2008) Complement and humoral immunity. Vaccine 26, I28–I33.

Chan A.C. & Carter P.J. (2010) Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. Nature Reviews Immunology 10, 301–316.

Di Noia J.M. & Neuberger M.S. (2007) Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. Annual Review of Biochemistry 76, 1–22.

Hozumi N. & Tonegawa S. (1976) Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 73, 3628–3632.

Hudson P.J. & Souriau C. (2003) Engineered antibodies. Nature Medicine 9, 129–134.

IMGT database: http://imgt.cines.fr

Jung D. & Alt F.W. (2004) Unraveling V(D)J recombination: insights into gene regulation. Cell 116, 299–311.

Maizels N. (2005) Immunoglobulin gene diversification. Annual Review of Genetics 39, 23–46.

Maki R., Traunecker, A., Sakano, H., Roeder, W. & Tonegawa, S. (1980) Exon shuffling generates an immunoglobulin heavy chain gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 77, 2138–2142.

Martin W.L., West A.P. Jr, Gan L. & Bjorkman P.J. (2001) Crystal structure at 2.8 Å of an FcRn/heterodimeric Fc complex: mechanism of pH-dependent binding. Molecular Cell 7, 867–877.

Matsuda F. & Honjo T. (1996) Organization of the human immunoglobulin heavy-chain locus. Advances in Immunology 62, 1–29.

McCormack W.T., Tjoelker L.W. & Thompson C.B. (1991) Avian B-cell development: generation of an immunoglobulin repertoire by gene conversion. Annual Review of Immunology 9, 219–241.

Metzger H. (2004) The high affinity receptor for IgE, FcεRI. Novartis Foundation Symposium 257, 51–59.

Min I.M. & Selsing E. (2005) Antibody class switch recombination: roles for switch sequences and mismatch repair proteins. Advances in Immunology 87, 297–328.

Nemazee D. (2006) Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. Nature Reviews Immunology 6, 728–740.

Neuberger M.S. (2008) Antibody diversification by somatic mutation: from Burnet onwards. Immunology and Cell Biology 86, 124–132.

Nimmerjahn F. & Ravetch J.V. (2008) Fcgamma receptors as regulators of immune responses. Nature Reviews Immunology 8, 34–47.

Padlan E.A. (1994) Anatomy of the antibody molecule. Molecular Immunology 31, 169–217.

Padlan E.A. (1996) X-ray crystallography of antibodies. Advances in Protein Chemistry 49, 57–133.

Parren P.W. & Burton D.R. (2001) The antiviral activity of antibodies in vitro and in vivo. Advances in Immunology 77, 195–262.

Peled J.U., Kuang F.L., Iglesias-Ussel M.D., Roa S., Kalis S.L., Goodman M.F. & Scharff M.D. (2008) The biochemistry of somatic hypermutation. Annual Review of Immunology 26, 481–511.

Perlot T. & Alt F.W. (2008) Cis-regulatory elements and epigenetic changes control genomic rearrangements of the IgH locus. Advances in Immunology 99, 1–32.
Roth D.B. (2003) Restraining the V(D)J recombinase. Nature Reviews Immunology 3, 656–666.
Schroeder H.W. Jr. & Cavacini L. (2010) Structure and function of immunoglobulins. Journal of Allergy and Clinical Immunology 125, S41–S52.
Swanson P.C. (2004) The bounty of RAGs: recombination signal complexes and complex outcomes. Immunological Reviews 200, 90–114.
Ward E.S. (2004) Acquiring maternal immunoglobulin; different receptors, similar functions. Immunity 20, 507–508.
Woof J.M. & Burton D.R. (2004) Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. Nature Reviews Immunology 4, 89–99.
Woof J.M. & Kerr M.A. (2006) The function of immunoglobulin A in immunity. Journal of Pathology 208, 270–282.
Yoo E.M. & Morrison S.L. (2005) IgA: an immune glycoprotein. Clinical Immunology 116, 3–10.
Zachau H.G. (2000) The immunoglobulin kappa gene families of human and mouse: a cottage industry approach. Biological Chemistry 381, 951–954.



CAPÍTULO 4

Receptores de membrana para el antígeno

Conceptos clave

A modo de resumen...

Tras la maduración por la exposición a los PAMP, las células dendríticas del sistema inmunitario innato inician las respuestas inmunitarias adaptativas a través de la **presentación de péptidos a las células T** dentro del contexto de moléculas del CMH. Estas últimas actúan como "carteleras" de unión al péptido adaptado para exponer fragmentos proteicos para la inspección por los receptores de las células T. En respuesta a una combinación apropiada de péptido-CMH (señal 1) y moléculas coestimuladoras B7 (señal 2) presentadas por la célula dendrítica, las células T se activan y sufren expansión clonal y diferenciación a células efectoras maduras. Por el contrario, las células B no requieren que el antígeno les sea presentado a ellas y son capaces de responder directamente a antígenos solubles o corpusculares a través de sus inmunoglobulinas unidas a la membrana (es decir, el receptor de la célula B). Por esto, los requisitos para el reconocimiento del antígeno por las células T y B son bastante diferentes. No obstante, la ocupación exitosa del receptor de la célula B o el de la T le confiere el poder al linfocito que responde a sufrir expansión clonal para producir numerosas células hijas idénticas capaces de reconocer el mismo antígeno. Así, el reconocimiento del antígeno por las células T o B es un paso de fundamental importancia en la iniciación de las respuestas inmunitarias adaptativas. En el Capítulo 1 se describió que las células NK pueden detectar diferencias en los patrones normales de expresión de moléculas de clase I del CMH. Como estas últimas se expresan normalmente en casi todas las células del cuerpo, su ausencia es tomada como un signo de peligro que acecha en el interior. Aquí trataremos con mayor detalle los receptores de membrana para el antígeno y cómo se adquiere la increíble diversidad que exponen estos receptores. También exploraremos la naturaleza del CMH, y las proteínas similares al CMH y su función central como interrelación entre las células del cuerpo y las del sistema inmunitario.

Roitt's Essential Immunology, Twelfth Edition. Peter J. Delves, Seamus J. Martin, Dennis R. Burton, Ivan M. Roitt.

Introducción

La interacción de los linfocitos con el antígeno tiene lugar a través de la unión de receptores especializados de la superficie celular, específicos para el antígeno, que funcionan como unidades de reconocimiento. En el caso de las células B, la situación es sencilla debido a que la inmunoglobulina unida a la membrana actúa como receptor para el antígeno (Figura 4.1a). Las células T utilizan receptores para el antígeno diferenciados que también se expresan en la membrana citoplasmática, pero los receptores de la célula T (TCR) difieren de los receptores de la célula B (BCR) de una manera muy radical; los TCR no pueden reconocer el antígeno libre como puede hacerlo la inmunoglobulina. La mayoría de las células T puede reconocer al antígeno sólo cuando se presenta dentro de la hendidura de unión al péptido de una molécula del CMH (Figura 4.1 b). Aunque esto puede parecer bastante engorroso, una ventaja muy importante de las células T respecto de las células B es que pueden reconocer los antígenos que en gran medida están confinados dentro de las células y, por consiguiente, resultan inaccesibles a las inmunoglobulinas. En este capítulo veremos que las moléculas del CMH tienen dos formas principales, denominadas de clase I y de clase II del CMH, respectivamente. La diferencia fundamental entre estas dos clases principales está en los compartimientos celulares de donde ellas adquieren sus cargas de péptidos. Las **moléculas de clase I del CMH presentan péptidos que provienen en gran medida de fuentes intracelulares, mientras que las moléculas de clase II adquieren los péptidos de fuentes extracelulares.** También hay otras diferencias, como las estructurales y las de expresión tisular, pero la consecuencia más importante de las localizaciones distintas de las que las diferentes clases de CMH adquieren sus péptidos es que el reconocimiento de un péptido cargado sobre una molécula de clase I del CMH dará por resultado la muerte de esa célula, mientras que el reconocimiento de un péptido dentro de una molécula de clase II activa sobre todo una respuesta positiva, incluso útil. Esto es así porque un péptido no propio que se forma dentro de una célula (y, en consecuencia, es presentado en la molécula de clase I del CMH) claramente significa una infección intracelular, y la manera más eficaz de tratar esto es destruir la célula infectada. Sin embargo, la presentación de un péptido no propio que se ha adquirido desde el exterior de la célula (mediante fagocitosis) denota una infección extracelular que no se resolverá al destruir la célula que origina la alarma. De hecho, las cosas están configuradas de manera tal que las únicas células capaces de presentar péptidos en las moléculas de clase II del CMH son aquellas que tienen un participación en la inmunidad. En cambio, casi todas las células expresan moléculas de clase I del CMH. Otra clase de leucocitos, las células *natural killer* (NK), también puede descubrir el problema que se prepara en el interior. Las células NK tienen sus propios receptores especiales que verifican los niveles adecuados de moléculas de clase I del CMH debido a que éstas se suelen expresar en casi todas las células nucleadas dentro del cuerpo. Los receptores NK también pueden detectar signos de anormalidad, como los aumentos en la expresión de proteínas de estrés por las células. En este capítulo enfocaremos sobre todo los aspectos estructurales de estos diversos tipos de receptores.

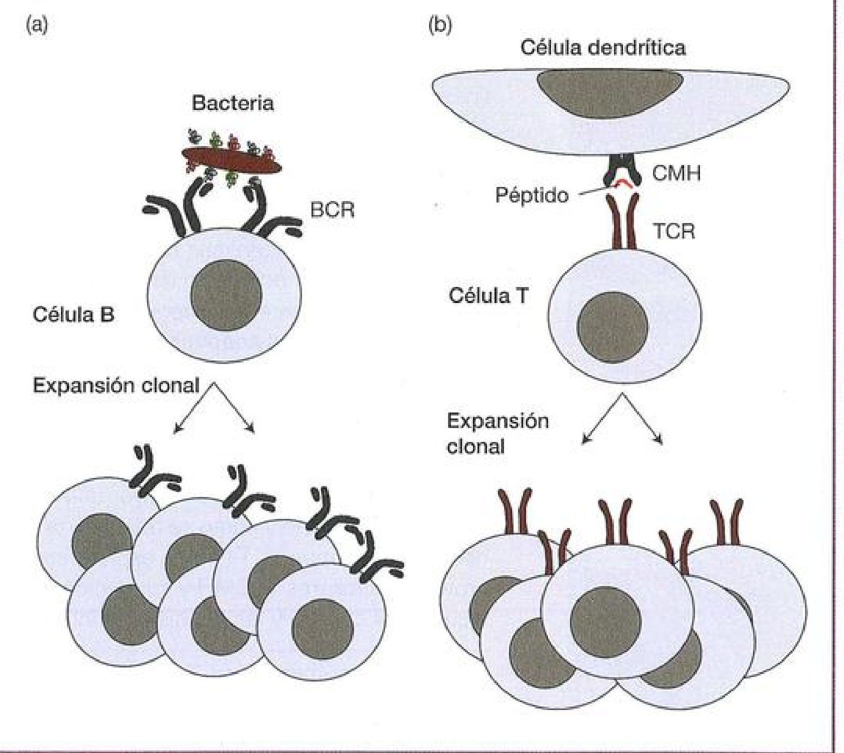


Figura 4.1. Las células B y T "ven" al antígeno en formas fundamentalmente diferentes.

a) En el caso de las células B, la inmunoglobulina unida a la membrana actúa como receptor de célula B (BCR) para el antígeno. b) Las células T usan receptores distintivos para el antígeno, que también se expresan en la membrana citoplasmática, pero los receptores de células T (TCR), a diferencia de las inmunoglobulinas, no pueden reconocer el antígeno libre. La mayoría de las células T sólo puede reconocer el antígeno cuando es presentado dentro de la hendidura de unión al péptido de una molécula del CMH. La estimulación productiva del BCR o del TCR da por resultado la activación del linfocito que posee el receptor, seguido por la expansión clonal y la diferenciación a células efectoras.

Receptores de superficie de la célula B para el antígeno (BCR)

La célula B inserta una inmunoglobulina transmembrana en su superficie

En el Capítulo 2 nos referimos al sistema sutil por el cual un antígeno puede ser conducido de manera inexorable a su destrucción mediante la activación de células B capaces de elaborar anticuerpos complementarios en su forma respecto de sí mismos a través de su capacidad de interacción con una copia de la molécula de anticuerpo situada en la superficie del linfocito. Debe recordarse que la unión del antígeno con el anticuerpo de la membrana puede activar la célula B y causar su proliferación, seguida de la maduración como un clon de plasmocitos secretores de anticuerpos específicos para el antígeno que le dio origen (véase la Figura 4.1a).

La tinción inmunofluorescente de las células B viables con antiinmunoglobulina (anti-Ig) marcada (p. ej., Figura 2.6b) revela que la inmunoglobulina de membrana de aparición más temprana es de la clase IgM. Cada célula B está programada para la producción de un único anticuerpo específico y de ese modo transcribe sus genes reordenados *VJCκ* (o *λ*) y *VDJCμ*. La inmunoglobulina puede ser secretada o expuesta sobre la superficie de la célula B por medio del mecanismo de **corte y empalme diferencial** del transcrito pre-mRNA que codifica una inmunoglobulina particular. La cadena inicial nuclear μ del transcrito de RNA incluye secuencias que codifican **regiones transmembrana hidrófobas**, que le permite a la IgM asentarse en la membrana, donde actúa como receptor de la célula B (BCR). Pero si estas regiones se eliminan por corte y empalme, las moléculas de anticuerpos pueden secretarse en la forma soluble (Figura 4.2).

Cuando la célula B madura, coexpresa un BCR que utiliza una IgD de superficie de la misma especificidad. Este fenotipo de la célula B IgM de superficie + IgD de superficie es abundante en los linfocitos de la zona del manto de los folículos linfoides secundarios (véase Figura 7.8d), y se logra por corte y empalme diferencial de un único transcrito que contiene segmentos VDJ, Cμ y Cδ que producen IgM o IgD de membrana (Figura 4.3). Con la maduración posterior de la célula B pueden expresarse en el BCR otros isotipos como IgG.

La inmunoglobulina de superficie forma complejos con las proteínas asociadas de la membrana

Cuando una inmunoglobulina es secretada ya no está más conectada físicamente con la célula B que le dio origen y no hay manera de que ésta perciba cuándo la Ig secretada ha encontrado el antígeno específico. Sin embargo, en el caso de la inmunoglobulina fijada en la membrana hay un eslabón directo entre el anticuerpo y la célula que lo elaboró, y esto puede ser aprovechado para instruir a la célula B para que amplíe su producción. Como es de conocimiento para cualquier industrial, una manera de aumentar la producción es abrir más plantas de elaboración y otra es incrementar el ritmo de productividad en cada una. Cuando se enfrenta con la perspectiva de un aumento súbito en la demanda para su producto particular, las células B realizan ambas cosas a través de la expansión clonal y la diferenciación en plasmocitos. ¿Cómo estimulan los BCR la actividad de la célula B ante el encuentro con el antígeno?

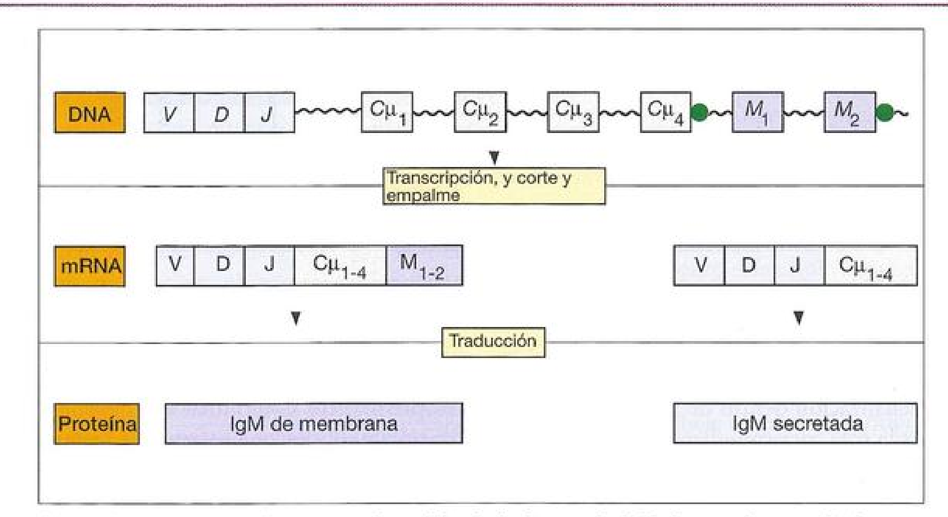


Figura 4.2. Mecanismo de corte y empalme para el cambio de la forma de IgM de membrana a la forma secretada.

El procesamiento alternativo determina si se produce una forma secretada o una forma unida a la membrana de la cadena pesada μ. Si se produce la terminación de la transcripción o la escisión en el intrón entre $C\mu_4$ y M_1, se utiliza la señal de adición $C\mu_4$ poli-A (AAUAAA) y se produce la forma secretada. Si la transcripción continúa a través de los exones de membrana, entonces $C\mu_4$ puede ser empalmado a las secuencias *M*, de lo cual resulta el empleo de la señal de adición M_2 poli-A. La secuencia hidrófoba codificada por los exones M_1 y M_2 se fija luego al receptor IgM en la membrana. Para simplificar se omitió la secuencia líder o guía. ~~~ = intrones.

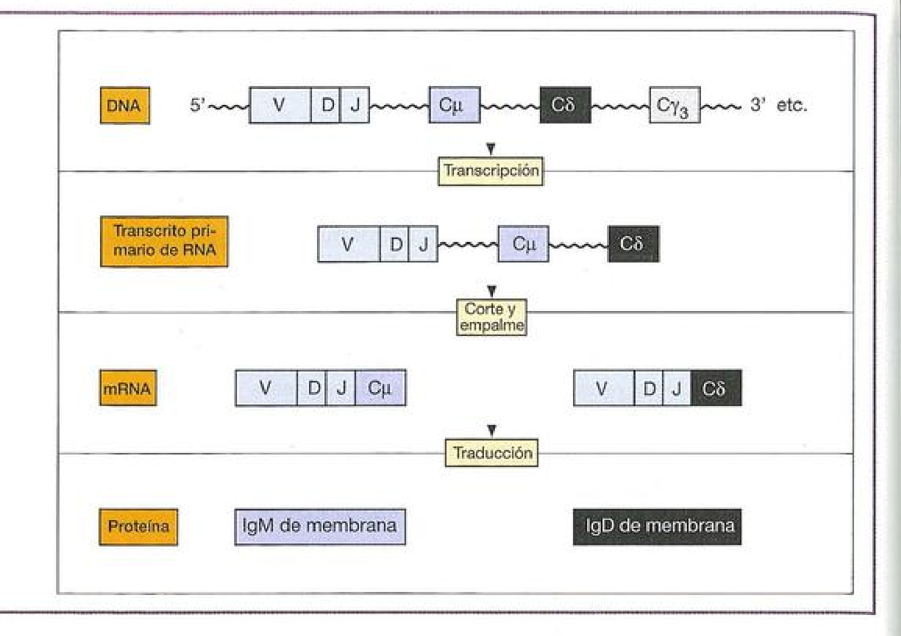


Figura 4.3. Los receptores de IgM e IgD de superficie de membrana de idéntica especificidad aparecen en la misma célula a través del corte y empalme diferencial del compuesto transcrito primario de RNA (de nuevo y con fines de simplificación, se omitieron las secuencias líder).

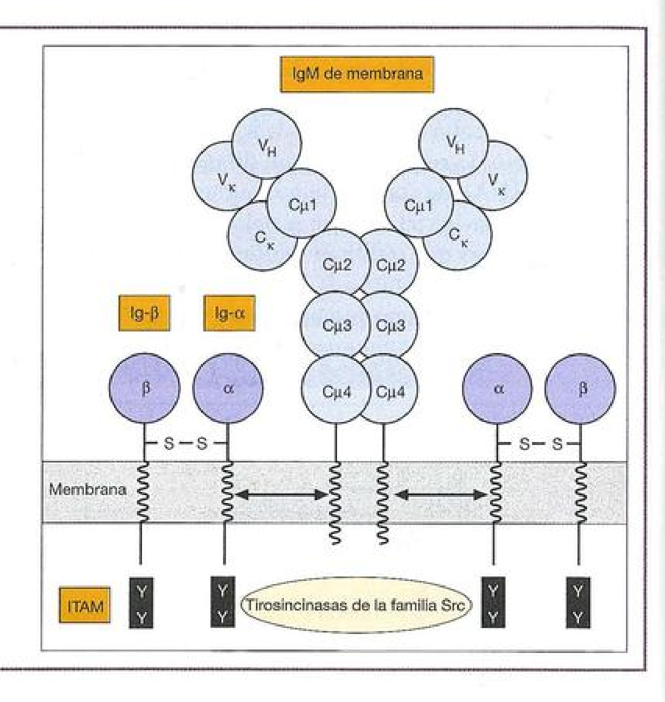


Figura 4.4. Modelo del complejo receptor de células B (BCR).
El heterodímero Ig-α/Ig-β es codificado por genes específicos de las células B *mb-1* y *B29*, respectivamente. Se observan dos de estos heterodímeros en los que la Ig-α se asocia con la región de la cadena μ de la IgM en el sitio que atraviesa la membrana. Los dominios extracelulares del tipo Ig se representan de color azul. Cada recuadro que contiene tirosina (Y) tiene una secuencia de estructura general $Tyr.X_2.Leu.X_7.Tyr.X_2.Ile$ (donde X no es un residuo conservado), denominado motivo de activación de inmunorreceptores basado en tirosina (ITAM). Con la activación de la célula B, estas secuencias de ITAM actúan como transductores de señal por su capacidad de asociarse con diversas tirosincinasas y ser fosforilados por estas enzimas. Adviértase que, aun cuando se ilustra una cadena ligera en la IgM de superficie, algunas células B utilizan una cadena ligera λ.

Al contrario de lo que sucede con muchos receptores de la membrana citoplasmática, que disponen de todas las clases de motivos de señalización dentro de sus colas citoplasmáticas, la región de la cola correspondiente de una IgM fija en la membrana tiene apenas tres aminoácidos. De ninguna manera este extremo podría dar cabida a los motivos estructurales requeridos para la interacción con proteínas adaptadoras, proteincinasas o fosfatasas intracelulares, que de manera característica inician las cascadas de transducción de señales. Con alguna dificultad, podría decirse que se aisló por fin un heterodímero unido por un enlace disulfuro **Ig-α (CD79a) e Ig-β (CD79b)** que copurifica con la inmunoglobulina de membrana y permite la transmisión de señales desde el BCR hacia el interior de la célula (Figura 4.4). Tanto la Ig-α como la Ig-β tienen un dominio del tipo de una inmunoglobulina extracelular, pero sus dominios citoplasmáticos C-terminal son indispensables para la señalización y son los que sufren una fosforilación en la activación celular por un enlace cruzado inducido por el antígeno del BCR (Figura 4.5), proceso asociado también con la rápida movilización del Ca^{2+}.

Cada Ig-α e Ig-β contiene un único **ITAM (*i*mmunoreceptor *t*yrosine-based *a*ctivation *m*otifs, motivos de activación de inmunorreceptor basados en tirosina)** dentro de sus colas citoplasmáticas, y este motivo presenta dos residuos de tirosina espaciados de modo preciso que son fundamentales para su función de señalización (Figuras 4.4 y 4.5). La ocupación del BCR con el antígeno conduce a la rápida

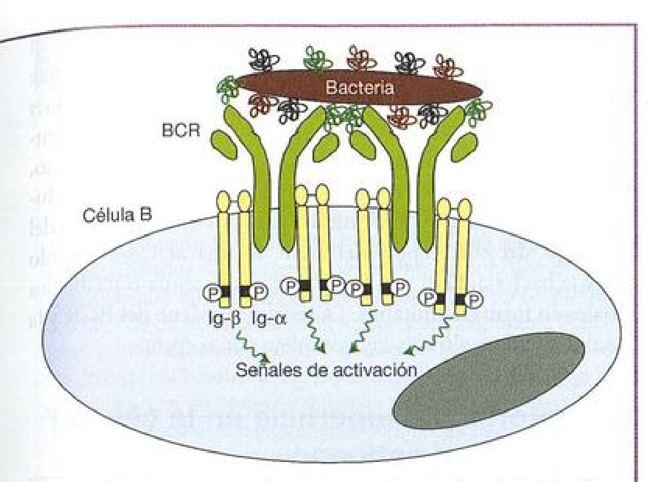


Figura 4.5. La agrupación del receptor de la célula B dirige la activación.

La activación del complejo BCR a través de la ocupación por el antígeno produce una señal de propagación como consecuencia de la fosforilación de los ITAM intracelulares dentro del heterodímero Ig-α/Ig-β.

fosforilación de las tirosinas dentro de cada ITAM por cinasas asociadas con el BCR, y esto tiene el efecto de crear sitios de unión para proteínas que muestran afinidad por los residuos de tirosina fosforilada. En este caso, una proteincinasa denominada **Syk** se asocia con el heterodímero fosforilado Ig-α/β y desempeña una función decisiva en la coordinación de acontecimientos que culminan con el ingreso de la célula B activada en el ciclo celular para comenzar la expansión clonal. Volveremos sobre este tema en el Capítulo 8, donde se analizará con mayor detalle la cascada de transducción de la señal del BCR.

El antígeno específico dirige la formación de microagregados del receptor de la célula B

Estudios recientes sugieren que muchos de los BCR no difunden libremente dentro de la membrana citoplasmática con sus heterodímeros Ig-α/β asociados, pero se confirmaron dentro de zonas específicas por el citoesqueleto de actina subyacente. El citoesqueleto de actina no tiene contacto con el BCR directamente sino que encierra al receptor en las zonas de confinamiento a través de la interacción con la proteína ezrina de la membrana. Hay una buena razón para este confinamiento porque parece ser necesario para prevenir la formación espontánea de **microagregados de BCR**, que se supone son las estructuras capaces de transmitir señales al interior de las células B que representa un estímulo de activación. Los microagregados de BCR están compuestos por 50-500 moléculas de BCR y se han visualizado en la superficie de las células B con técnicas de microscopia avanzadas. De hecho, la mera despolimerización del citoesqueleto de actina parece ser suficiente para permitir que se produzcan en forma espontánea señales débiles de activación de las células B, sin requerimiento alguno de antígeno; esto sugiere que el confinamiento en el citoesqueleto es necesario y actúa como una "captura de seguridad" en la activación del BCR. En realidad, las señales de base débiles o "tónicas" del BCR parecen ser necesarias para el desarrollo de las células B debido a que la interferencia con esta situación produce la muerte de las células B en desarrollo. Se presume que una pequeña fracción de la dotación de BCR que difunde libremente en la membrana citoplasmática proporciona esta señalización tónica.

La activación de la célula B parece exigir que muchos BCR sean desplazados de sus zonas de confinamiento para ser reclutados en microagregados, un acontecimiento que por evidencias recientes se sugiere que se logra a través de cambios de la conformación inducidos por el antígeno dentro de la región constante del anticuerpo que permite la autoasociación dentro de la membrana. La estimulación más eficaz del BCR también se consigue a través del **entrecruzamiento del BCR con su complejo correceptor**, que se describe a continuación. Es posible la activación de la célula B a través de la sola estimulación del BCR, pero tiende a conducir a la producción de IgM de baja afinidad, y es mucho menos preferible que la coestimulación por medio del complejo del correceptor de BCR.

También hay un reconocimiento creciente de que, mientras que las células B pueden ser estimuladas por el antígeno soluble, **la forma principal de antígeno que desencadena la activación de la célula B *in vivo* se localiza sobre todo en las superficies de la membrana.** La fuente más probable de antígeno localizado en la membrana se encuentra en las células foliculares dendríticas que residen dentro de los ganglios linfáticos, y están especializadas en capturar los complejos de antígeno rodeado por complemento que difunden al interior de estos tejidos linfoides. La interacción entre una célula B y el antígeno inmovilizado en la membrana brinda la oportunidad para que la membrana de la célula B se extienda a lo largo de la membrana opuesta que porta el antígeno y que reúne antígeno suficiente para provocar la formación de microagregados y activar la célula B.

Además de proporcionar un estímulo óptimo de activación, puede haber otra razón de por qué las células B pretenden ocupar con el antígeno específico tantos BCR como sea posible. Esto se debe a que **las células B activadas necesitan ayuda** de las células T *helper*, en la forma de estimulación por citocinas y receptor CD40, para llevar a cabo el cambio de clase y la hipermutación somática. Esta ayuda sólo tiene lugar pronto si la célula B puede presentar el antígeno a las células T en el contexto de moléculas de clase II del CMH. Así, cuanto mayor es el antígeno capturado por una célula B estimulada, más eficaz será luego adquirir ayuda de las células T. De esta manera, la extensión a lo largo de una superficie revestida de antígeno facilita la interacción de muchos BCR con el antígeno, que luego puede ser internalizado por las células B para ser procesado y presentado a las células T *helper*. El tema de las interacciones entre las células T y las células B se analizará con mayor detalle en los Capítulos 8 y 9.

El complejo correceptor de la célula B actúa en sinergia con el BCR para activar las células B

Ya hemos hecho referencia al modelo de dos señales para la activación de las células T vírgenes. Del mismo modo, **las**

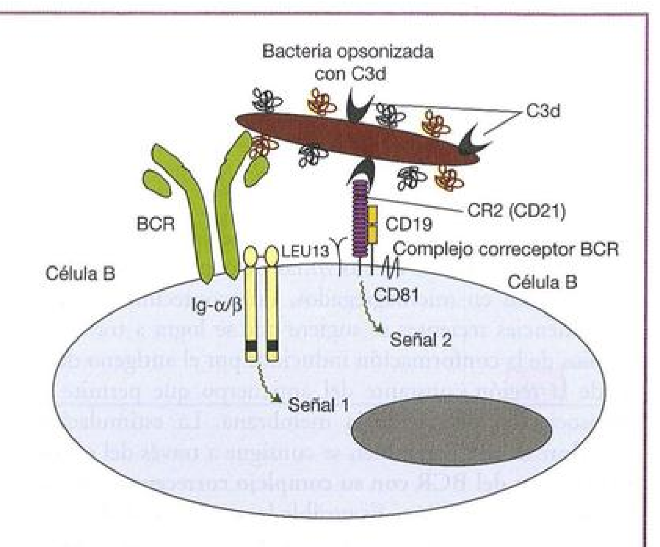


Figura 4.6. El complejo correceptor de la célula B actúa en sinergia con el BCR para activar las células B.

El complejo correceptor de la célula B está compuesto por cuatro componentes: CD19, CD21 (receptor del complemento de tipo 2, CR2), CD81 (TAPA-1) y CD225 (LEU13, proteína 1 transmembrana inducida por interferón, véase también la Figura 8.19). Dado que CR2 es un receptor para el producto de degradación C3d del complemento, su presencia dentro del complejo correceptor BCR posibilita que el complemento actúe en sinergia con el BCR, de ese modo se refuerzan las señales de activación de las células B.

células B también requieren dos señales (con algunas excepciones) para ser activadas de modo productivo, y es probable que esto represente una salvaguardia para limitar la producción de autoanticuerpos. De hecho, como analizaremos con mayor detalle en el Capítulo 8, en realidad son dos tipos distintos de coestimulación que necesita recibir una célula B, en diferentes momentos, para que sea verdaderamente óptima la activación y el ulterior cambio de clase y maduración de la afinidad. Una forma de coestimulación tiene lugar en el punto inicial del encuentro del BCR con su antígeno cognado y está provista por el **complejo correceptor de la célula B**, capaz de interactuar con moléculas como el complemento, que pueden estar unidas en la misma superficie (p. ej., en una bacteria) que expone el antígeno específico reconocido por el BCR (Figura 4.6). La otra forma de coestimulación requerida por las células B tiene lugar después del encuentro inicial con el antígeno y es proporcionada por las células T en la forma **de ligando CD40** asociado a la membrana que interactúa con el CD40 de la superficie de la célula B. Como esto no es necesario para la activación inicial, pero es muy importante para el cambio de clase y la hipermutación somática, analizaremos la coestimulación dependiente del CD40L en el Capítulo 8.

El complejo correceptor de células B (Figura 4.6) está compuesto por cuatro componentes: CD19, CD21 (receptor de complemento de tipo 2, CR2), CD81 (TAPA-1) y LEU13 (proteína transmembrana 1 inducida por interferón). El CR2 es un receptor para el producto de degradación C3d del complemento y su presencia dentro del complejo correceptor del BCR permite que el complemento actúe en sinergia con el BCR que, por lo tanto, incrementa el entrecruzamiento, que promueve la formación del microagregado. Así, en situaciones en que una bacteria ha activado el complemento y está recubierta con los productos de activación del complemento, cuando con posterioridad es capturada por el BCR de la célula B existe entonces la oportunidad para que el CR2 dentro del complejo del correceptor del BCR se una al C3d ubicado sobre la bacteria. Esto significa que ahora la célula B recibe dos señales en forma simultánea. La señal 1 proviene del BCR y la señal 2 la recibe a través del complejo correceptor.

Receptores de superficie en la célula T (TCR) para el antígeno

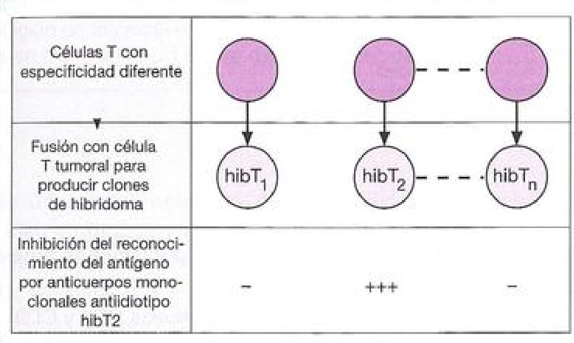
Como se mencionó antes, las células T interactúan con el antígeno de una manera bastante distinta de la que lo hacen las células B; los receptores con los cuales la mayoría de las células T están equipadas no pueden ser ocupados directamente por los antígenos solubles, pero en cambio "ven" fragmentos cortos de antígeno que están inmovilizados dentro de una hendidura estrecha en la superficie de moléculas del CMH (Figura 4.1b). Como analizaremos con mayor detalle en el Capítulo 5, las moléculas del CMH se unen a fragmentos peptídicos cortos de 10 a 20 aminoácidos de longitud que representan muestras de "control de calidad" de las proteínas que expresa una célula en un momento dado, o que ha internalizado a través de la fagocitosis, de acuerdo con el tipo de molécula del CMH. De esta manera, las células T pueden inspeccionar de modo eficaz lo que sucede, desde un punto de vista antigénico, dentro de una célula en cualquier momento dado al examinar el espectro de péptidos que se presentan dentro de las moléculas del CMH. Otra diferencia importante entre los receptores de las células B y T es que las células T no pueden secretar sus moléculas receptoras de la manera en que las células B pueden cambiar la producción de inmunoglobulina desde una forma unida a la membrana a la forma secretada. Aparte de estas diferencias, los **receptores de las células T** son bastante similares desde el punto de vista estructural al anticuerpo debido a que también se forman a partir de módulos basados en plegamientos de inmunoglobulina.

Antes de examinar los aspectos estructurales de los receptores de las células T, recuérdese que la función práctica de estos receptores es permitir que una célula T analice las superficies de las células en busca de péptidos no propios. Si una célula T encuentra una combinación péptido-CMH que es una buena correspondencia para su receptor de célula T (TCR) se activará, sufrirá expansión clonal y se diferenciará a una célula T efectora madura, capaz de unirse a la lucha contra el agente infeccioso que genera estos péptidos no propios. En la práctica, esta eventualidad es un acontecimiento de muy baja probabilidad porque, como veremos, los TCR se generan de manera que producen una variedad enorme de estos receptores, cada uno con su propia especificidad exquisita para una combinación péptido-CMH particular. Además, como la mayoría de los péptidos presentados en las moléculas del CMH en cualquier momento deriva de sí mismo (a menos que la célula presentadora de antígeno esté infectada por un microorganismo), esto reduce aún más la probabilidad de que

Avances y descubrimientos 4-1—Receptores de la célula T

Dado que los linfocitos T responden mediante la activación y la proliferación cuando se ponen en contacto con el antígeno presentado por células como macrófagos, era razonable suponer que lo hacían por medio de receptores situados en su superficie. En cualquier caso, si las células T carecieran de esos receptores sería difícil considerarlas partícipes de la selección clonal. Guiados por el racero de Occam (el principio de la parsimonia, que afirma que el objetivo de la ciencia es presentar los hechos de la naturaleza en fórmulas conceptuales más simples y más económicas), la mayoría de los investigadores se decidió por la hipótesis de que la naturaleza no incurriría en la extravagancia de hacer evolucionar dos especies de reconocimiento molecular absolutamente separadas para las células B y las células T, y se desperdiciaron muchos años en la búsqueda del Santo Grial del receptor de la célula T con sueros antiinmunoglobulina o anticuerpos monoclonales. El éxito sólo se obtuvo cuando fue utilizado un anticuerpo monoclonal dirigido contra el idiotipo de una célula para bloquear la respuesta al antígeno. Éste se identificó por su capacidad de bloquear un clon de células T entre un número grande, y se conjeturó de manera correcta que la estructura que permitía esta selectividad sería el sitio de combinación para el antígeno en el receptor de la célula T. La inmunoprecipitación con ese anticuerpo puso de manifiesto un heterodímero unido por enlaces (puentes) disulfuro, que estaba constituido por subunidades de 40-44 kDa (Figura A4.1.1).

El otro enfoque se dirigió directamente a los genes, con los argumentos que siguen. El receptor de la célula T sería una proteína integral de membrana no presente en las células B. En consecuencia, el mRNA polisómico de la célula T proveniente del retículo endoplasmático, que proporcionaría una abundante fuente del transcrito apropiado, fue utilizado para preparar cDNA, a partir del cual se extrajeron los genes comunes a ambas células B y T por hibridación con el mRNA de la célula B. Los clones específicos T resultantes se emplearon para explorar un gen de la célula T, que es reordenado en todas las células T maduras desde el punto de vista funcional, pero que permanece en su configuración de línea germinal en todos los otros tipos celulares (Figura A4.1.2). De este modo se descubrieron los genes que codifican la subunidad β del receptor de la célula T.



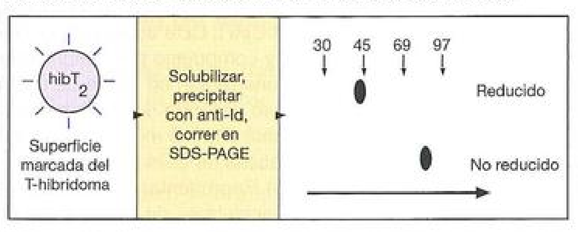


Figura A4.1.1. El anticuerpo contra el receptor de la célula T (antiidiotipo) bloquea el reconocimiento del antígeno.

(Basado en Haskins K., Kubo R., White J., Pigeon M., Kappler J. y Marack P. [1983] *Journal of Experimental Medicine* **157**, 1149; simplificado en parte).

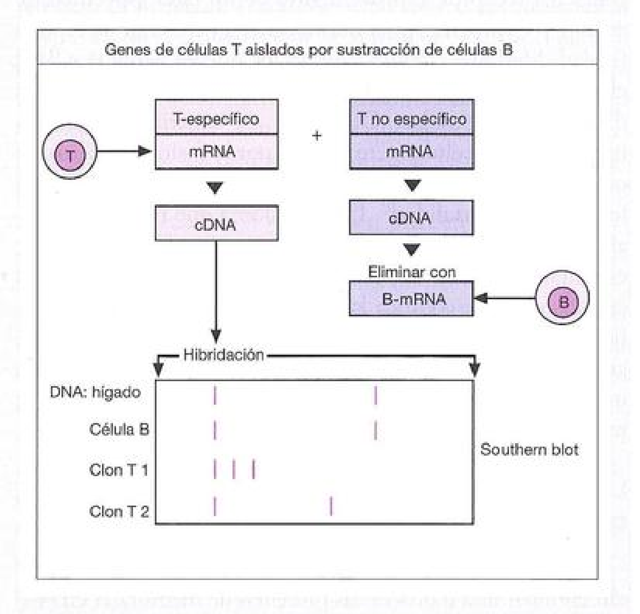


Figura A4.1.2. Aislamiento de los genes del receptor de célula T.

Fragmentos de DNA de diferentes tamaños producidos por una enzima de restricción, separados por electroforesis y probados con el gen de célula T. Las células T muestran el reordenamiento de uno de los dos genes de la línea germinal encontrado en las células hepáticas o en las células B. (Basado en Hendrick S.M., Cohen D.I., Nielsen E.A. y Davis M.M. [1984] *Nature* **308**,149).

una célula T encuentre una combinación péptido no propio-CMH perfecta para activar una respuesta.

El receptor para el antígeno es un heterodímero transmembrana

La identificación del TCR resultó más difícil de lo que se preveía en un inicio (Avances y descubrimientos 4.1), pero al final se determinó que el receptor es una molécula unida a la membrana compuesta por dos cadenas vinculadas por enlaces disulfuro, α y β. Cada cadena se pliega en dos dominios del tipo Ig, uno que tiene una estructura relativamente invariable y el otro que muestra un alto grado de variabilidad, de modo que el TCRαβ es en su estructura bastante parecido al fragmento Fab de la inmunoglobulina. Esta analogía se extiende incluso más; cada una de las dos regiones

variables tiene tres regiones hipervariables (o regiones determinantes de complementariedad, CDR), que según los datos obtenidos por difracción de rayos X incorporan los aminoácidos que establecen contacto con el ligando péptido-CMH. La plasticidad de las asas de las CDR es una factor importante que posibilita a los TCR modelarse alrededor de combinaciones péptido-CMH diferentes desde el punto de vista estructural. Aunque aún no se conoce por completo la manera por la cual el TCR toma contacto con el péptido-CMH, parece que en algunos TCR, a las CDR1 y 2 del TCR les competería gran parte de la responsabilidad de establecer el contacto con la molécula propia del CMH, mientras que la CDR3 haría contacto con el péptido; sin embargo, en otros TCR la inversa es cierta. Cualesquiera que sean las CDR que determinan el contacto del CMH con el péptido, está claro que éstas son los componentes de reconocimiento del receptor y, por lo tanto, es aquí donde se observa gran parte de la variabilidad entre los TCR, como describiremos más adelante.

Para la especificidad del antígeno se requieren ambas cadenas, α y β, como se demuestra por transfección de los genes del receptor T provenientes de un clon específico de células T citotóxicas para fluoresceína a otro clon de especificidad diferente; cuando expresó los nuevos genes α y β, el clon transfectado adquirió la capacidad de lisar las células diana fluoresceinadas. Otro tipo de experimento utilizó hibridomas de células T formados por la fusión de células T específicas para el antígeno con tumores de células T para lograr la "inmortalidad". Un hibridoma que reconoció ovoalbúmina de pollo, presentada por un macrófago, dio lugar espontáneamente a dos variantes, una de las cuales perdió el cromosoma que codifica la cadena α y, la otra, la que codifica la cadena β. Ninguna de las variantes reconoció el antígeno, pero cuando se las fusionó por métodos físicos, cada una proporcionó la cadena complementaria del receptor y se restauró la reactividad con el antígeno.

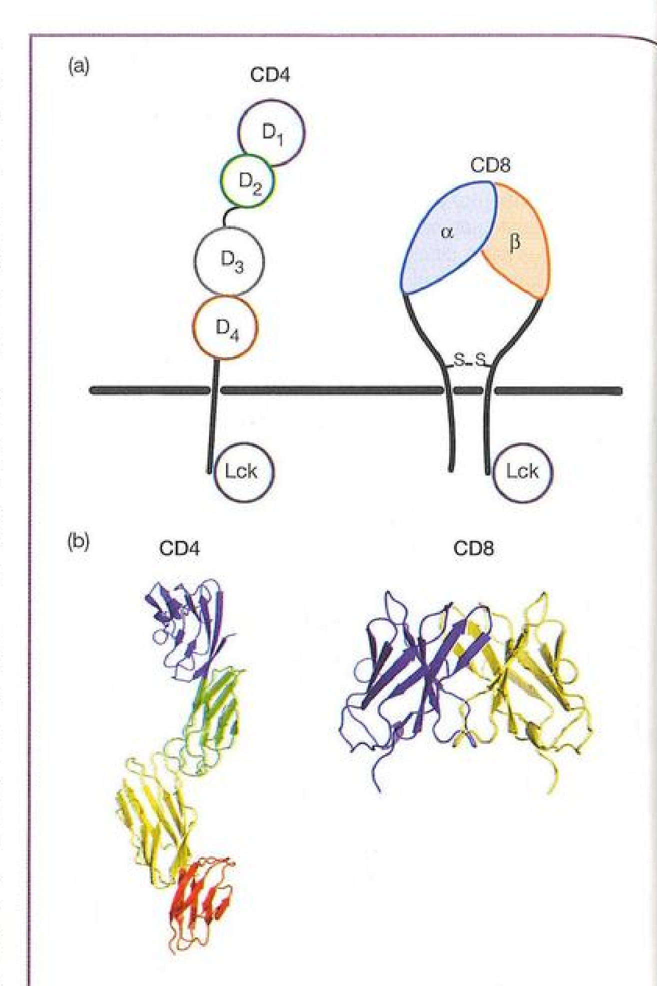


Figura 4.7. CD4 y CD8 actúan como correceptores para las moléculas del CMH y definen subpoblaciones funcionales de células T.

a) Representación esquemática de moléculas CD4 y CD8. CD4 está compuesto por cuatro dominios de tipo Ig (D_1 a D_4) y se proyecta desde la superficie de la célula T para interactuar con moléculas clase II del CMH. CD8 es un heterodímero unido por enlaces disulfuro y compuesto por subunidades α y β de tipo Ig conectadas a una región en forma de bastón intensamente glucosilada que se extiende desde la membrana citoplasmática. CD8 interactúa con las moléculas clase I del CMH. Las colas citoplasmáticas de CD4 y CD8 se asocian con la tirosincinasa Lck. b) Representación en diagrama de cintas de las porciones extracelulares de CD4 y CD8. Los dominios del tipo Ig (D_1 a D_4) de CD4 figuran en azul, verde, amarillo y rojo, respectivamente. Se muestra un homodímero CD8 de dos subunidades α. (Las estructuras fueron gentilmente proporcionadas por el doctor Dan Leahy y se basan en informes de Leahy y cols. [1992] *Cell* **68**, 1145 y Wu y cols. [1997] *Nature* **387**, 527).

Las moléculas CD4 y CD8 actúan como correceptores para los TCR

Además del TCR, casi todas las células T periféricas expresan también una u otra de las proteínas de membrana **CD4 o CD8** que actúan como correceptores para las moléculas del CMH (Figura 4.7). CD4 es una sola cadena polipeptídica que contiene cuatro dominios tipo Ig compactados firmemente en forma de bastón que se proyecta desde la superficie de la célula T. La cola citoplasmática de la molécula CD4 es importante para la señalización del TCR debido a que esta región está constitutivamente unida por una proteína tirosincinasa, **Lck**, que comienza la cascada de transducción de la señal tras el encuentro de la célula T con el antígeno (Figura 4.8). El CD8 desempeña una función similar a CD4; también se une a Lck y recluta esta cinasa al complejo TCR, pero presenta una estructura bastante distinta; CD8 es un heterodímero de cadenas α y β unidas por enlaces disulfuro, cada una de las cuales contiene un solo dominio de tipo Ig conectado con un polipéptido extenso e intensamente glucosilado que se proyecta desde la superficie de la célula T (Figura 4.7).

Las moléculas CD4 y CD8 desempeñan funciones importantes en el reconocimiento del antígeno por las células T porque estas moléculas determinan si una célula T puede reconocer el antígeno presentado por las moléculas del CMH que obtienen sus antígenos peptídicos principalmente de fuentes intracelulares (**clase I del CMH**) o extracelulares (**clase II del CMH**). Esto tiene implicaciones funcionales fundamentales para la célula T por cuanto aquellos linfocitos activados tras el encuentro con el antígeno presen-

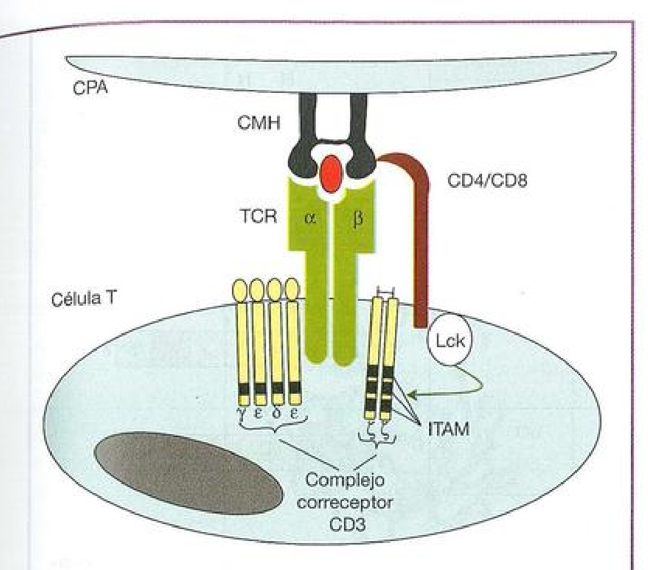


Figura 4.8. El complejo del receptor de la célula T (TCR), asistido por los receptores CD4 o CD8, reconoce el péptido antigénico en el contexto de las moléculas del CMH. Las señales de activación del TCR son propagadas por el complejo correceptor CD3, que está formado por las cadenas γ, ε, δ, y ξ de CD3. El agrupamiento de CD4 o CD8, que están constitutivamente asociados con la cinasa Lck, facilita con el complejo TCR la señal de propagación iniciada por Lck a través de la fosforilación de los motivos de activación de inmunorreceptor basados en tirosina (ITAM) dentro de la cadena ξ de CD3.

tado dentro de moléculas de clase I del CMH (células T CD8+) invariablemente se convierten en células T citotóxicas, y los que se activan por péptidos presentados por moléculas de clase II del CMH (células T CD4+) se convierten en células T *helper* (véase Figura 8.1).

Hay dos clases de receptores de células T

No mucho después del avance sensacional que representó la identificación del receptor αβ de la célula T aparecieron publicaciones acerca de la existencia de un segundo tipo de receptor compuesto por cadenas γ y δ. Debido a que aparece más temprano en la ontogenia del timo, en oportunidades el receptor γδ se denomina **TCR1** y el receptor, αβ **TCR2** (véase p. 293). Las células γδ representan sólo entre el 1 y el 5% de las células T que circulan en la sangre y los órganos periféricos de la mayoría de los animales adultos; sin embargo, estas células muestran un predominio mayor en los tejidos con gran componente epitelial, como la piel, el intestino, el aparato reproductor y los pulmones, donde llegan a constituir casi el 50% de la población de células T. Es innegable que las células T γδ son en cierto modo singulares entre las células T; a diferencia de las células T αβ, las células γδ no parecen exigir que el antígeno sea presentado en el contexto de las moléculas del CMH y se considera que pueden reconocer el antígeno soluble de manera similar a las células B. Quizá debido a esta falta de dependencia del CMH para la presentación del antígeno, la mayoría de las células T γδ no expresa ambos correceptores del CMH, CD4 o CD8 (Cuadro 4.1).

El mecanismo de reconocimiento del antígeno por las células T γδ es todavía desconocido, pero se sabe que estas células pueden interactuar con moléculas afines al CMH, como las proteínas murinas T10 y T22, de una manera que no requiere el antígeno. Dado que estas moléculas similares al CMH se sobreexpresan con la activación de las células T αβ, se conjeturó que las células T γδ pueden tener una importante función inmunorreguladora; como se vuelven activas en presencia de moléculas que aparecen en las células T activadas, las células T γδ pueden ayudar a la regulación de las respuestas inmunitarias de manera positiva o negativa. Las células T γδ también pueden reconocer lípidos, fosfoésteres orgánicos, conjugados nucleotídicos y otros ligandos no peptídicos provenientes de patógenos.

Ciertas células T γδ (la subpoblación Vγ1 Vδ1, que están en grandes cantidades en los tejidos epiteliales) también comparten algunas características de reconocimiento de las células NK del sistema inmunitario innato; ambas pueden reconocer las proteínas similares a la clase I del CMH MICA y MICB, que no actúan como moléculas presentadoras de antígeno. En cambio, MICA y MICB están presentes de modo típico en concentraciones bajas en los tejidos epiteliales, pero se sobreexpresan en respuesta al estrés celular, que incluye el choque térmico y el daño del DNA. La infección por citomegalovirus o *Mycobacterium tuberculosis* también es capaz de inducir la aparición en la superfi-

Cuadro 4.1. Comparación entre células T αβ y γδ.

Característica	Células T αβ	Células T γδ
Receptor para el antígeno	Complejo TCR αβ + CD3	Complejo TCR γδ + CD3
Forma del antígeno reconocido	CMH + péptido	Moléculas similares del CMH más ligandos no proteicos
Expresión CD4/CD8	Sí	Principalmente no
Frecuencia en sangre	60-75 %	1-5 %
Restricción por CMH	Sí	Principalmente no
Función	Colabora con la activación del linfocito y del macrófago Destrucción citotóxica	¿Función inmunorreguladora? Actividad citotóxica

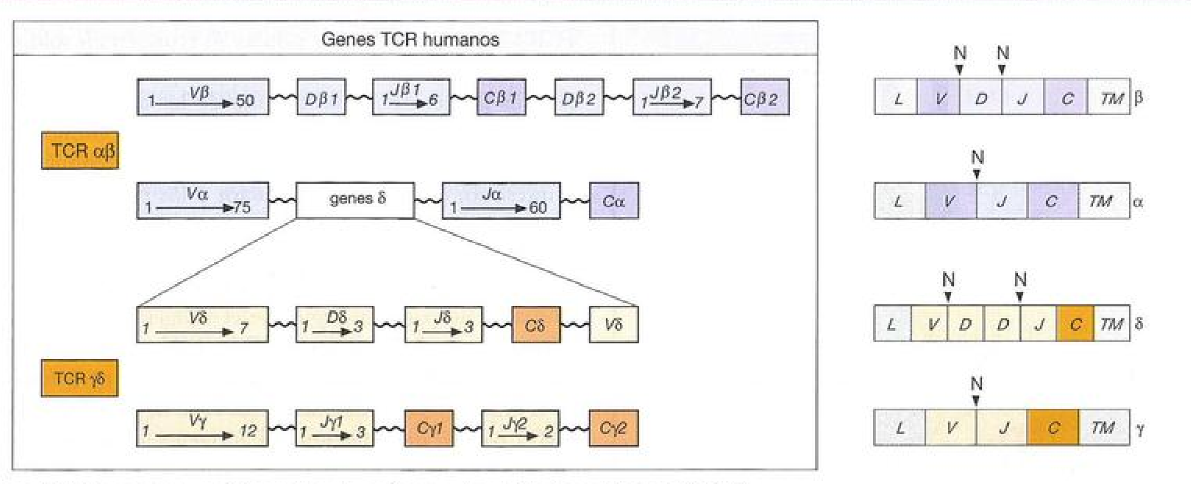


Figura 4.9. Genes que codifican los receptores αβ y γδ de las células T (TCR).

Los genes que codifican las cadenas δ se hallan entre los grupos *Vα* y *Jα*, y algunos segmentos V en esta región pueden ser utilizados en las cadenas δ o α, es decir, como *Vα* o *Vδ*. Los genes TCR se reordenan de un modo análogo al observado en los genes de las inmunoglobulinas, que incluye la diversidad de la región N en las uniones *V(D)J*. Uno de los genes Vδ se encuentra en dirección 3' del gen Cδ y se reordena por un mecanismo de inversión.

cie de estas moléculas similares al CMH primitivas y casi con seguridad existen otros ligandos de células T γδ inducibles por estrés. Como veremos más adelante en este capítulo, MICA y MICB también son usadas por las células NK como ligandos de activación, aunque es este caso participa un receptor muy diferente.

La codificación de los receptores de células T es similar a la de las inmunoglobulinas

Los segmentos génicos que codifican las cadenas β del TCR siguen el reordenamiento de los segmentos *V, D, J* y constantes muy similar al descrito para las inmunoglobulinas (Figura 4.9). De un modo similar, cuando se forma una célula T inmunocompetente, tiene lugar un reordenamiento de los genes *V, D* y *J* para formar una secuencia *VDJ* continua. La evidencia más firme de que las células B y T utilizan mecanismos de recombinación similares proviene de estudios realizados en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (IDCG) que tienen un único defecto autosómico recesivo que impide la recombinación adecuada de los segmentos *V, D* y *J*. Los mutantes homocigotos son incapaces de producir células B y T inmunocompetentes y se observan defectos de secuencias idénticas en la formación de la unión *VDJ*, tanto en la línea de células pre-B como en la de pre-T.

Si se observa en primer lugar el grupo de la cadena *β*, uno de los dos genes *Dβ* se reordena cerca de uno de los genes *Jβ*. Debido al modo en que se organizan los genes, el primer gen *Dβ* $D\beta_1$, puede utilizar cualquiera de los 13 genes *Jβ*, pero $D\beta_2$ sólo puede elegir entre los siete genes $J\beta_2$ (Figura 4.9). A continuación, uno de los 50 genes *Vβ* es reordenado para el segmento *DβJβ* preformado. **La variabilidad en la formación de la unión** y la **inserción al** azar **de nucleótidos** para crear la diversidad de la región N a cada lado del segmento *D* son los mismos fenómenos que los observados en los reordenamientos del gen de la inmunoglobulina. El análisis de la secuencia pone énfasis en la analogía con la molécula de anticuerpo; cada segmento *V* contiene dos regiones hipervariables, mientras que la secuencia de unión *DJ* proporciona la estructura **muy hipervariable** CDR3, lo cual hace un total de seis regiones de complementariedad potencial que determina las zonas de unión con el antígeno en cada TCR (Figura 4.10). Como sucede en la síntesis de anticuerpos, el intrón entre VDJ y C es eliminado del mRNA antes de la traducción con la restricción de que estos reordenamientos incluyen genes del grupo $D\beta_2J\beta_2$ que sólo puede unirse a $C\beta_2$.

Todas las otras cadenas de los TCR son codificadas por genes formados mediante translocaciones similares. La dotación génica de la cadena *α* carece de segmentos *D* pero tiene un número prodigioso de segmentos *J*. El número de genes *Vγ* y *Vδ* es pequeño en comparación con el de *Vα* y *Vβ*. Como en la dotación de la cadena *α*, el grupo de la cadena *β* carece de segmentos *D*. La situación de los locus *δ* dentro del grupo del gen *α* da como resultado células T que han sufrido una combinación *Vα-Jα* carente de genes *δ* en el cromosoma reordenado; en otras palabras, los genes *δ* son eliminados por completo.

El complejo CD3 es una parte integral del receptor de la célula T

El reconocimiento complejo del antígeno por la célula T y su equivalente en la célula B puede asemejarse a pelotones militares especializados cuyo trabajo es enviar una señal en el momento de avistar al enemigo. Cuando el TCR "divisa al enemigo", es decir que se une al antígeno, envía al interior del linfocito T una señal mediante un complejo asociado de polipéptidos transmembrana (**CD3**) con el fin de instruir a la célula para que despierte de su estado latente G0 y haga algo útil, como convertirse en una célula efectora. En todas las células T competentes, el TCR no está unido de manera covalente pero sí íntimamente con el CD3 en un complejo que, como se sabe en la actualidad, puede conte-

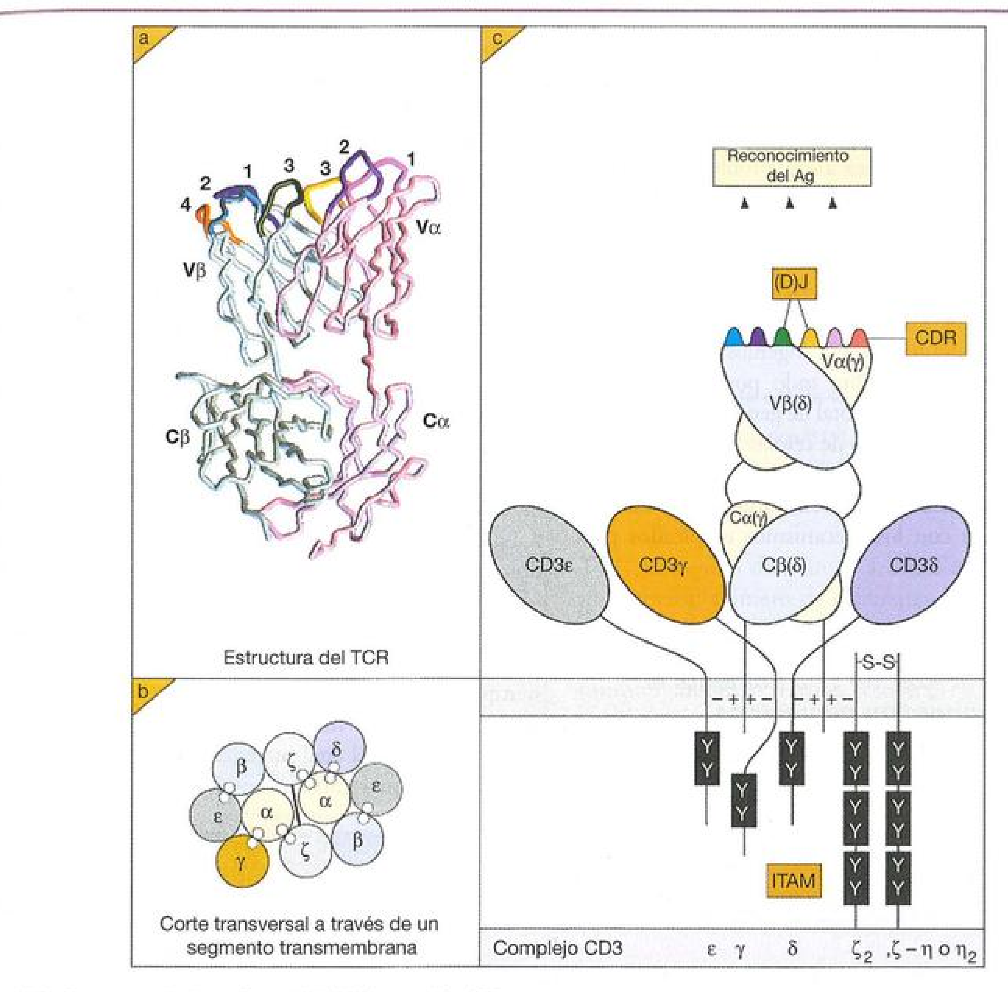


Figura 4.10. Receptor de la célula T (TCR)/complejo CD3.

El TCR se asemeja en cuanto a su estructura al fragmento Fab de unión al antígeno de la inmunoglobulina. Los segmentos variable y constante de las cadenas α y β del TCR (VαCα/VβCα), y de las cadenas γ y δ correspondientes del TCRγδ, pertenecen desde el punto de vista estructural a la familia de dominios similares a la inmunoglobulina. a) En el modelo, las cadenas β de las CDR están coloreadas de magenta (CDR1), violeta (CDR2) y amarillo (CDR3), mientras que la cadena β de las CDR aparecen de azul (CDR1), azul marino (CDR2) y verde (CDR3). La cuarta región hipervariable de la cadena β (CDR4), que constituye parte del sitio de unión para ciertos superantígenos, está coloreada de anaranjado. (Reproducido de *Garcia* K. y cols. [1998] *Science* **279**, 1166, con autorización). b) Los TCR pueden expresarse en pares unidos al complejo CD3. Las cargas negativas en los segmentos transmembrana de las cadenas invariables del complejo CD3 se ponen en contacto con las cargas opuestas en las cadenas Cαy Cβ del TCR, como se ilustra. c) Los dominios citoplasmáticos de las cadenas peptídicas de CD3 contienen motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina (ITAM; véase receptor de célula B, Figura 4.4) que toman contacto con las proteínas tirosincinasas src. No debe confundirse el TCR γδ y las cadenas γδ del CD3.

ner dos unidades de reconocimiento heterodiméricas TCR αβ o γδ en contacto estrecho con una molécula de las cadenas polipeptídicas invariables γ y δ del CD3, dos moléculas de CD3ε, más el dímero ξ-ξ unido por puentes disulfuro. En consecuencia, el complejo total tiene la estructura $TCR_2\text{-}CD3\gamma\delta\varepsilon_2.\xi_2$ (Figuras 4.8 y 4.10b).

Al igual que el heterodímero de Ig-α/β asociado con BCR, las cadenas de CD3 también contienen uno o más ITAM y estos motivos, de nuevo, desempeñan una función decisiva en la propagación de las señales de activación al interior del linfocito. Tras el encuentro del TCR con el péptido-CMH, los ITAM dentro del complejo CD3 se fosforilan a residuos tirosina; éstos actúan luego como una plataforma para el reclutamiento de innumerables proteínas de unión fosfotirosina que diseminan aún más las señales a lo largo de la célula T. Es entonces cuando la función de los correceptores CD4 y CD8 se torna evidente; la fosforilación de los ITAM dentro de la cadena ξ de CD3 se cumple mediante la tirosincinasa Lck que, como se recordará, se asocia con las colas citoplasmáticas de CD4 y CD8 (Figuras 4.7 y 4.8). En los ratones, una o ambas cadenas ξ pueden ser remplazadas por una variante que sufrió un proceso de corte y empalme proveniente del gen ξ denominada η. La cadena ξ también se asocia con el receptor FcγRIIIA en las células *natural killer* (NK), donde actúa como parte del mecanismo de transducción de la señal en ese contexto. Describiremos la transducción de la señal iniciada por el TCR con mucho mayor detalle en el Capítulo 8.

Generación de diversidad para el reconocimiento del antígeno

Sabemos que el sistema inmunitario tiene que ser capaz de reconocer virtualmente cualquier patógeno que haya surgido o pueda surgir. La solución genética a este problema de anticiparse a un futuro imprevisible implica la generación de millones de receptores específicos para antígenos diferentes, tal vez muchísimos más de los que necesitará el individuo durante toda su vida. Ya que esto excede en gran medida la cantidad estimada de alrededor de 25.000 a 30.000 genes en el cuerpo humano, debe haber alguna manera ingeniosa de generar la totalidad de esta diversidad, sobre todo porque en un ser humano en particular el número total de genes *V, D, J* y *C* que codifican anticuerpos y receptores de células T ronda los 400. Haremos una revisión de la genética de la diversidad de anticuerpos e investigaremos las enormes similitudes, y las diferencias ocasionales, vistas con los mecanismos empleados para generar la diversidad de TCR.

Amplificación intracatenaria de la diversidad

La combinación al azar de VDJ aumenta la diversidad en proporción geométrica

Como se expuso en el Capítulo 3, así como en los juegos de construcción para niños, como el LEGO®, se puede usar un número relativamente pequeño de piezas para crear una enorme variedad de obras maestras de la arquitectura, los segmentos génicos individuales de los receptores pueden considerarse los ladrillos que permiten formar una multiplicidad de receptores específicos para el antígeno en las células B y T. Las regiones variables de la cadena ligera de la inmunoglobulina se constituyen a partir de los segmentos *V* y *J*, y las regiones variables de la cadena pesada, a partir de los segmentos *V, D* y *J*.

Del mismo modo, para los receptores de las células T αβ y γδ la región variable de una de las cadenas (α o γ) está codificada por un segmento *V* y un segmento *J*, mientras que la región variable de la otra cadena (β o δ) está codificada además por un segmento *D*. En cuanto a los genes de la inmunoglobulina, las enzimas RAG-1 y RAG-2 reconocen secuencias señal de recombinación (RSS) adyacentes a las secuencias codificantes de los segmentos génicos *V, D* y *J*. Las RSS consisten en heptámeros y nonámeros conservados, separados por espaciadores de 12 o de 23 pares de bases (véase p. 72) y se encuentran en el extremo 3' de cada segmento *V*, en ambos extremos 5' y 3' de cada segmento *D* y en el extremo 5' de cada segmento *J*. En el reordenamiento siempre se incluye un segmento *D*; Vβ no puede unirse directamente a Jβ ni tampoco Vδ directamente a Jδ. Para ver el modo por el cual se genera la diversidad de secuencia para TCR, tomaremos como ejemplo el TCR αβ (Cuadro

Cuadro 4.2. Cálculos de la diversidad de genes V en seres humanos. Se sabe que el número preciso de segmentos génicos presenta variaciones individuales; quizás entre 40 y 70 en el caso de los genes v_h por ejemplo, de modo que estos cálculos representan cifras "típicas". Se calcula el número de especificidades generado por la combinación directa al azar de segmentos de la línea germinal. Éstos aumentarán por los mecanismos adicionales que se enumeran: *supuesto mínimo de aproximadamente 10 variantes para las cadenas carentes de segmentos *D* y 100 para las cadenas con segmentos *D*. El cálculo para la cadena b del receptor de célula T requiere una explicación adicional. El primero de los dos segmentos *D*, *Dβ*, puede combinarse con 50 genes V y con la totalidad de los 13 genes $J\beta_1$ y $J\beta_2$. $D\beta_2$ se comporta de manera similar, pero sólo puede combinarse con los siete genes Jβ2 que siguen hacia el extremo 3'.

	γδTCR (TCR1)		TCR αβ (TCR2)		Ig		
						L	
	γ	δ	α	β	H	κ	λ
Segmentos del gen *V*	12	~8	75	50	40	40	30
Segmentos del gen *D*	–	3	–	1,1	27	–	–
Segmentos del gen *J*	3,2	3	60	6,7	6	5	5
Unión de combinación al azar	*V* × *J*	*V* × *D* × *J*	*V* × *J*	*V* × *D* × *J*	*V* × *D* × *J*	*V* × *J*	*V* × *J*
(sin diversidad de la unión)	12 × 5	8 × 3 × 3	75 × 60	50 (13 + 7)	40 × 27 × 6	40 × 5	30 × 5
Total	60	72	4.500	1.000	6.480	200	150
Heterodímeros combinatorios	60 × 72		4.500 × 1.000		6.480 × 200		6.480 × 150
Total (redondeado)	$4,3 \times 10^3$		$4,5 \times 10^6$		$1,3 \times 10^6$		1×10^6
Otros mecanismos: D en tres marcos de lectura, diversidad de la unión, inserción en la región N* × 10^3	$4,3 \times 10^6$		$4,5 \times 10^9$		$1,3 \times 10^9$		1×10^9
Mutación somática	–		–		+++		+++

Cadena β del TCR del DNA de la línea germinal:

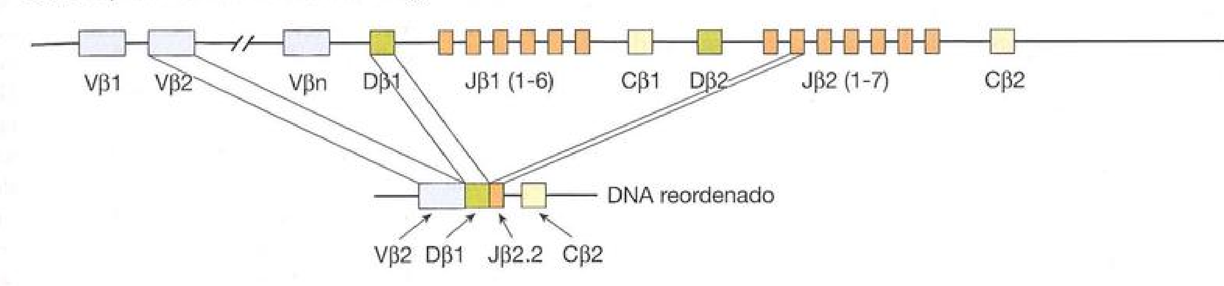


Figura 4.11. Reordenamiento del locus génico de la cadena β del receptor de la célula T.

En este ejemplo, Dβ1 ha sido reordenado a Jβ2.2, y luego el gen Vβ2 fue seleccionado entre los 50 genes Vβ (Vβn). Si se hubieran utilizado los mismos segmentos V y D, pero esta vez se hubiese empleado Jβ1.4, entonces se habría usado el segmento génico Cβ1 gen en lugar de Cβ2.

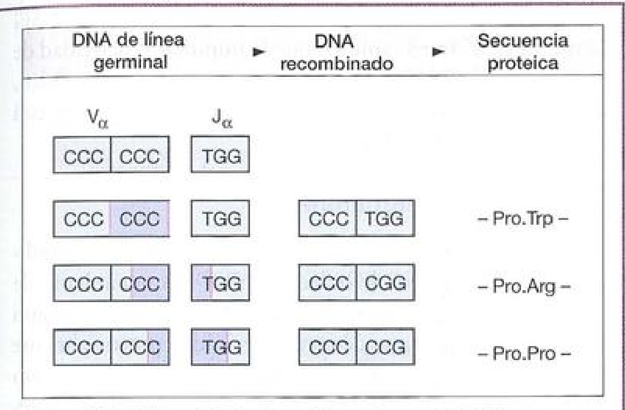


Figura 4.12. Diversidad de unión entre un TCR Vα y un segmento de la línea germinal Jα que produce tres variantes de secuencias de proteína.

El triplete de nucleótidos que es eliminado por corte y empalme aparece de color azul más oscuro. Para los genes de la cadena β del TCR y la cadena pesada de la Ig, la diversidad de unión puede aplicarse a los segmentos *V*, *D* y *J*.

4.2). Aunque el número preciso de segmentos génicos varía de un individuo a otro, de modo característico hay alrededor de 75 segmentos génicos *Vα* y 60 segmentos génicos *Jα*. Si se produjese una **unión aleatoria** completa de cualquier segmento *V* con cualquier segmento *J*, se tendría la posibilidad de generar 4.500 combinaciones *VJ* (75 × 60). Con respecto a la cadena β del TCR, hay alrededor de 50 genes Vβ que quedan hacia el extremo 5' de los dos grupos de genes DβJβ cada uno de los cuales está asociado con un gen Cβ (Figura 4.11). El primer grupo, que se asocia con Cβ1, tiene un solo gen Dβ1 y 6 genes Jβ1, en tanto que el segundo grupo, asociado con Cβ2, de nuevo tiene un solo gen Dδ (Dβ2) con 7 genes Jβ2. El segmento *D*β1 puede combinarse con cualquiera de los 50 genes *V*β y con cualquiera de los 13 genes *J*β1 y de *J*β2 (Figura 4.11). *D*β2 se comporta de manera similar, pero sólo puede combinarse con uno de los 7 genes *J*β2. Esto proporciona 1.000 posibles combinaciones diferentes de VDJ para la cadena β del TCR. Por consiguiente, aunque los genes *V*, *D* y *J* de las cadenas α y β del TCR aumentan de manera aritmética hasta 200, producen un inmenso número de diferentes regiones variables α y β por **recombinación geométrica** de los elementos básicos. Pero, como sucede con el reordenamiento génico de las inmunoglobulinas, esto es sólo el principio.

Jugando con las uniones

Otra táctica para conseguir una mayor variación del repertorio de la línea germinal que es utilizado tanto por los genes del receptor de la células T como por los de las inmunoglobulinas (véase figura 3.25) consiste en las recombinaciones limítrofes variables de *V*, *D* y *J* para dar lugar a diferentes secuencias de unión (Figura 4.12).

Como se expresó en el Capítulo 3, la diversidad adicional se produce a partir de la generación de secuencias palindrómicas (elementos P) que se originan por la formación de estructuras en horquillas durante el proceso de recombinación y la inserción de nucleótidos en la región N entre los segmentos *V*, *D* y *J*, proceso asociado con la expresión de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal. Mientras que estos mecanismos agregan nucleótidos a la secuencia, puede crearse aún más diversidad por la actividad de las nucleasas en los extremos de la hebra expuestos para la eliminación de nucleótidos. Estos procesos aumentan en gran medida el repertorio, lo cual es especialmente importante para los genes γ y δ del TCR, que serían de otro modo bastante limitados en cantidad.

Otros mecanismos se relacionan de manera específica con la secuencia de la región *D*; en particular en el caso de los genes del TCR δ donde el segmento *D* puede leerse en tres marcos de lectura diferentes y pueden unirse dos segmentos *D*. Tales combinaciones *DD* producen una tercera región determinante de complementariedad más larga (CDR3) que se encuentra en otros TCR o moléculas de anticuerpos.

El hecho de que la CDR3 en las diversas cadenas del receptor esté compuesta fundamentalmente por las regiones entre los segmentos de *V(D)J*, donde los mecanismos de diversidad de unión pueden introducir un grado muy alto de variabilidad de aminoácidos, explica por qué esta asa hipervariable contribuye en gran medida a la delicada especificidad de unión a estas moléculas.

Corrección del receptor

En observaciones recientes se estableció que los linfocitos no necesariamente se fijan al receptor de antígeno que producen en un comienzo; si no les gusta, pueden cambiarlo. El remplazo de un receptor no deseado por uno que tiene características más aceptables se conoce como corrección ("edición") del receptor. Este proceso fue descrito tanto para las inmunoglobulinas como para el TCR, lo cual permite el remplazo de reordenamientos no funcionales o especificidades autorreactivas. Además, la corrección del receptor en la periferia puede rescatar células B de baja afinidad, provenientes de la muerte celular por apoptosis, mediante el remplazo de un receptor de baja afinidad por uno capaz de ser seleccionado con afinidad más alta. Que esto suceda en la periferia está sustentado por el hallazgo de que las células B maduras en los centros germinativos pueden expresar RAG-1 y RAG-2 que median el proceso de reordenamiento.

Pero, ¿cómo se realiza este trabajo de corrección del receptor? En el caso de las cadenas del receptor que carecen de segmentos génicos *D*, es decir, la cadena ligera de la inmunoglobulina y la cadena β del TCR, puede producirse un reordenamiento secundario por un segmento génico *V* en la dirección del segmento *VJ* reordenado anteriormente por recombinación con el extremo 3' de la secuencia del gen *J;* ambos segmentos presentan RSS intactas que son compatibles (Figura 4.13a). Sin embargo, en el caso de las cadenas pesadas de la inmunoglobulina y las cadenas β del TCR, el proceso de reordenamiento del *VDJ* suprime la totalidad de las RSS asociadas con el segmento *D* (Figura 4.13b). Como V_H y J_H tienen espaciadores de 23 pares de bases en sus RSS, no pueden recombinarse: se infringiría la regla 12/23. Este obstáculo evidente para la corrección del receptor de esas cadenas puede ser superado por la presencia de una secuencia próxima al extremo 3' de las secuencias que codifican *V* y que puede funcionar como una RSS sustituta, de tal modo que el nuevo segmento *V* simplemente remplazaría al *V* reordenado con anterioridad, mientras mantiene la misma secuencia *D* y *J* (Figura 4.13b). Es probable que éste sea un proceso relativamente ineficaz y, en consecuencia, la corrección del receptor puede producirse con más facilidad en las cadenas ligeras de la inmunoglobulina y en las cadenas α del TCR que en las cadenas pesadas de la inmunoglobulina y en las cadenas β del TCR. En realidad, se sugirió que la cadena α del TCR puede sufrir una serie de reordenamientos con deleciones continuas de segmentos *VJ* previamente funcionales hasta que se produce un TCR que puede ser seleccionado.

Reconocimiento de las regiones genómicas correctas por la recombinasa RAG

Una pregunta que recién ahora comienza a resolverse es cómo la recombinasa RAG-1/RAG-2 selecciona las regiones genómicas correctas para la recombinación. Está claro que sería desastroso si este complejo fuera capaz de acceder al DNA al azar dejando en su estela rupturas en la doble cadena. Un mecanismo de protección es inducir la expresión de RAG sólo dónde y cuándo es necesario, pero no explica cómo el complejo RAG está dirigido sólo a los locus de Ig y TCR en las células en que se expresa. Este acertijo se explica por las observaciones que sugieren que las **alteraciones en las histonas**, las proteínas en las que está empaquetado el DNA, marcan locus particulares para la unión al complejo RAG. Estudios recientes revelaron que la histona H3 modificada por trimetilación de la lisina en la posición 4 (H3K4me3) actúa como un sitio de unión para RAG-2. Así, las regiones genómicas que están preparadas para la recombinación de VDJ se encuentran cerca de las "marcas" de la histona H3K4me3. Coherente con esta idea, la ablación experimental de las marcas H3K4me3 produce una recombinación V(D)J profundamente afectada. Pero esta marca H3K4me3 se encuentra en muchos más sitios a lo largo de todo el genoma que en los que hay locus de receptor para el antígeno. Así, ¿cómo encuentra el complejo RAG-1/RAG-2 los sitios correctos? La respuesta parece ser que la especificidad de RAG-1 para los sitios RSS, combinada con la de RAG-2 para las marcas de cromatina H3K4me3, puede actuar como una abrazadera que guía la recombinasa hacia las localizaciones correctas. La unión del complejo RAG a la marca H3K4me3 también puede impulsar la actividad de recombinasa de RAG-1 a través de un mecanismo alostérico, que aumenta la actividad catalítica del complejo cuando está ubicada en la localización correcta.

Amplificación intercatenaria

El sistema inmunitario realizó un ingenioso avance al utilizar dos tipos diferentes de cadenas para el reconocimiento de las moléculas porque la combinación origina no sólo un sitio de combinación más grande con una afinidad potencialmente mayor, sino también una nueva variabilidad. El apareamiento de las cadenas pesada y ligera entre las inmunoglobulinas parece ser en gran medida al azar y, por lo tanto, dos células B pueden emplear la misma cadena pesada pero diferentes cadenas ligeras. Esta vía para producir anticuerpos de diferente especificidad se observa con facilidad *in vitro*, donde distintas cadenas ligeras pueden combinarse con la misma cadena pesada para producir un cambio pequeño o a veces incluso para alterar la especificidad final del anticuerpo. En general, la evidencia disponible sugiere que la contribución principal *in vivo*, en lo que se refiere a la diversidad y especificidad, proviene de la cadena pesada, quizás en relación con el hecho de que la cadena pesada CDR3 lleva a una situación decisiva en la carrera hacia la diversidad, por decirlo así, codificada por las uniones entre los tres segmentos génicos: *V, D* y *J*.

Esta asociación al azar entre las cadenas γ y δ del TCR, las cadenas α y β del TCR y las cadenas pesada y ligera de la Ig aporta un aumento geométrico adicional en la diversidad. En el Cuadro 4.2 se observa que alrededor de 230 segmentos de la línea germinal de receptores funcionales de células T y 153 de Ig funcionales pueden dar lugar a 4,5 millones y 2,2 millones, respectivamente, de combinaciones distintas, por asociaciones directas, *sin* tomar en consideración todos los mecanismos sofisticados de unión descritos con anterioridad. ¡Saquémonos los sombreros frente a la evolución!

Hipermutación somática

Como se mencionó en el Capítulo 3, hay evidencia ineludible que genes de la región *V* de la inmunoglobulina pueden

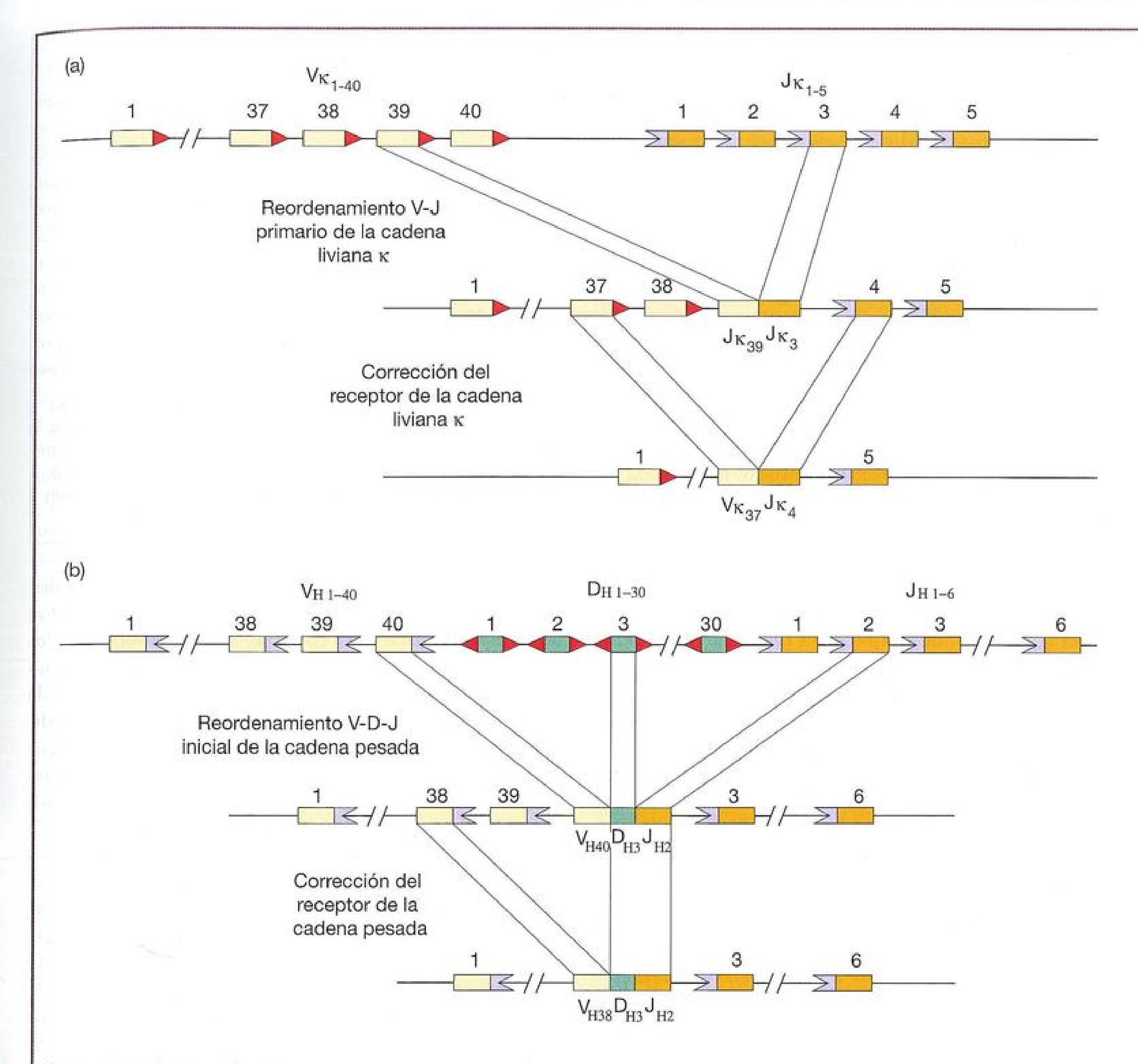


Figura 4.13. Corrección del receptor.

a) En la cadena ligera de la inmunoglobulina o la cadena α del TCR, las secuencias señal de recombinación (RSS; motivos heptámero-nonámero) en el extremo 3' de cada segmento variable (*V*) y en el extremo 5' de cada segmento de unión (*J*) son compatibles entre sí y, en consecuencia, puede producirse un nuevo reordenamiento total, como se muestra en la figura. Esto produciría un receptor con una secuencia variable de la cadena ligera diferente (en este ejemplo $Vk_{37}Jk_4$ que sustituye a Vk_{39} Jk_3) junto con la cadena pesada original. b) Respecto de la cadena pesada de la inmunoglobulina o la cadena β del TCR, la organización de las secuencias heptámeros-nonámeros en la RSS impide que un segmento *V* se recombine directamente con el segmento *J*. Esto es la denominada regla 12/23 por la cual las secuencias heptámeros-nonámeros asociadas con un espaciador de 23 pares de bases (de color violeta) sólo pueden aparear las bases con secuencias heptámeros-nonámeros que contengan un espaciador de 12 pares de bases (de color rojo). La cadena pesada *V* y *J* tiene una RSS con un espaciador de 23 pares de bases y por esto es un no iniciador. Además, todos los segmentos no reordenados se suprimieron, de modo que no hay espaciadores remanentes de 12 pares de bases. Es probable que esta barrera evidente al reordenamiento secundario sea vencida por la presencia de una secuencia tipo RSS cerca del extremo 3' de las secuencias codificadas por el gen *V*, de modo que sólo es sustituido el segmento del gen *V* (en el ejemplo, la secuencia $V_{H38}D_{H3}J_{H2}$ sustituye a $V_{H40}D_{H3}J_{H2}$).

sufrir una significativa **hipermutación somática.** El análisis de 18 mielomas λ murinos reveló que 12 presentaban una estructura idéntica, 4 mostraron sólo un cambio de aminoácido, 1 con dos cambios y 1 con cuatro cambios, todos dentro de las regiones hipervariables e indicativos de hipermutación somática del único gen de línea germinal λ del ratón. En otro estudio, después de la inmunización con antígeno neumocócico, un único gen de línea germinal T15 V_H dio lugar por mutación a diversos genes V_H, los cuales codificaron en su totalidad anticuerpos antifosforilcolina (Figura 4.14).

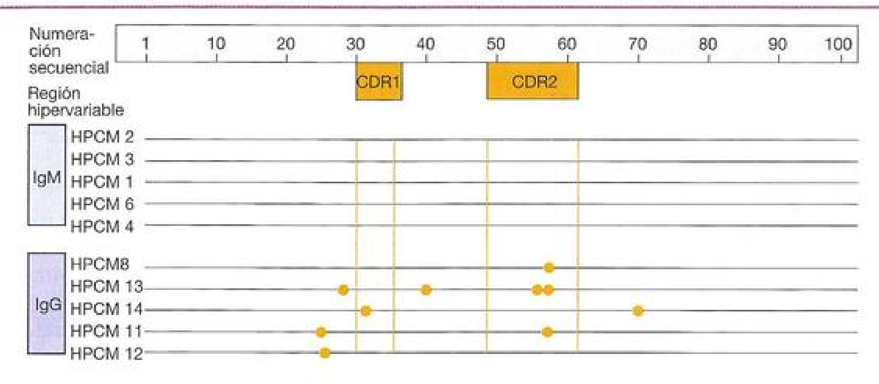


Figura 4.14. Mutaciones en un gen de la línea germinal.

Las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H de cinco IgM y cinco IgG de anticuerpos monoclonales contra fosforilcolina generados durante una respuesta antineumocócica en un solo ratón se comparan con la estructura primaria de la secuencia de la línea germinal T15. Una línea indica la identidad con el prototipo T15 y un círculo anaranjado, una sola diferencia de aminoácido. Las mutaciones sólo se produjeron en las moléculas de IgG y se observan en ambos segmentos, hipervariable y estructural. (Según Gearhart P.J. [1982] *Immunology Today* **3**,107.) Mientras que en algunos estudios la hipermutación somática se observó en los anticuerpos IgM, la cantidad de mutaciones por lo común aumenta en gran medida después del cambio de clase.

Algunas características de este fenómeno de diversificación somática merecen una mención especial. Las mutaciones son el resultado de sustituciones únicas de nucleótidos, están restringidas a la región variable y se producen tanto en la región estructural como en la región hipervariable. La tasa de mutación es notablemente alta, alrededor de 1×10^{-3} por par de base por generación, que es cerca de un millón de veces más alta que para otros genes de mamíferos. Además, el mecanismo de mutación está ligado de alguna manera con la recombinación para el cambio de clase, ya que la enzima **citidina desaminasa inducida por activación** (AID; *actvation-induced cytidine deaminase*) es necesaria para ambos procesos y la hipermutación es más frecuente en los anticuerpos IgG e IgA que en IgM, y afecta a ambas cadenas, pesada (Figura 4.14) y ligera. Sin embargo, los genes V_H presentan en promedio más mutaciones que los genes V_L. Esto podría ser el resultado de que la corrección del receptor actúa con más frecuencia en las cadenas ligeras, lo cual tendría un efecto de "barajar y dar de nuevo" en lo que respecta a las mutaciones del gen *V* de las cadenas ligeras, mientras mantiene ya acumuladas las mutaciones puntuales del gen *V* de la cadena pesada.

Como describimos en el Capítulo 3, la AID inicia tanto la recombinación de cambio de clase como la hipermutación somática a través de la desaminación de la desoxicitidina en ciertos puntos de gran actividad denominados "puntos calientes" (*hotspots*) del DNA que se caracterizan por la presencia de secuencias WRC (W = A o T, R = purina y C es la desoxicitidina que se convierte en desaminada). Aunque en un inicio se consideró que el sitio específico de la AID era el RNA, pruebas más recientes indican que esta enzima actúa directamente sobre el DNA, aunque no se descarta la riboedición. La desaminación de la desoxicitidina cambia esta base a un desoxiuracilo que normalmente podría repararse por enzimas de reparación del error de apareamiento, pero por razones que no son del todo comprendidas, puede dar por resultado la eliminación del uracilo mal apareado que genera una brecha que es rellenada por una polimerasa propensa a producir un error para generar una mutación puntual en esta posición, y también pueden mutar bases circundantes. No queda claro cómo la AID se dirige a las localizaciones correctas en las regiones V de los genes Ig reordenados, para asegurar que las mutaciones no se introduzcan inadvertidamente en otros locus, pero de modo similar a la recombinasa RAG, podría implicar modificaciones específicas de la histona. Las versiones hiperacetiladas de las histonas H3 y H4 parecen ser más abundantes en las regiones V de mutación que en las regiones C de los genes Ig. Esta observación, junto con las observaciones de que la AID es reclutada para transcribir activamente los genes de Ig por proteínas que se unen a secuencias CAGGTG encontradas en todos los potenciadores de la transcripción de la Ig, sugiere un mecanismo posible. Así, la combinación del motivo de secuencia CAGGTG, junto con las histonas modificadas descritas antes, puede colocar la AID en las localizaciones correctas para que puedan actuar.

La hipermutación somática no parece contribuir de manera significativa al repertorio disponible en las fases tempranas de la respuesta primaria, pero sucede durante la generación de memoria y es la que pone a punto la respuesta para lograr una mayor afinidad.

Datos recientes subrayan que aún existe otro mecanismo para crear más diversidad, que implica la inserción o la deleción de intervalos cortos de nucleótidos dentro de la secuencia del gen *V* de la inmunoglobulina, tanto de la cadena pesada como de la ligera. Este mecanismo tendría un efecto intermedio en el reconocimiento del antígeno, y es más llamativo que una única mutación puntual, pero mucho más sutil que la corrección del receptor. En un estudio se empleó una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) para amplificar los genes V_H y V_L expresados a partir de 365 células B IgG+, y se comprobó que el 6,5% de las células contenía inserciones o deleciones de nucleótidos. Los transcritos fueron dejados en la estructura y no se introdujeron codones de terminación con estas modificaciones. Es probable que el porcentaje de células que contienen esas alteraciones haya sido subestimado. Todas las inserciones y deleciones estaban dentro de la CDR1, de la CDR2 o de ambas, o bien

en sus proximidades. La diversidad de la región N de la CDR3 significó que no era posible analizar la tercera región hipervariable para las inserciones o deleciones de este tipo y, por consiguiente, podrían ser pasadas por alto en el análisis. El hecho de que las alteraciones estaban asociadas con CDR sugiere que las células B habían estado sujetas a la selección por el antígeno. También fue notable que las inserciones y las deleciones se produjeron en puntos "calientes" conocidos de la mutación puntual somática, y la misma DNA polimerasa propensa a error que determina la hipermutación somática también puede estar implicada aquí. Las secuencias a menudo fueron una duplicación de una secuencia adyacente en el caso de las inserciones o la deleción de una secuencia repetida conocida. Este tipo de modificación, al igual que como en la corrección del receptor, puede desempeñar una función importante en la eliminación de la autorreactividad y también en el incremento de la afinidad del anticuerpo.

Por otra parte, **los genes del receptor de la célula T no suelen sufrir hipermutación somática**. Se argumentó que ésta sería una medida de seguridad útil debido a que las células T son seleccionadas de manera positiva en el timo por reacciones débiles con el CMH propio (véase p. 297), de modo que las mutaciones podrían conducir fácilmente a la aparición de receptores autorreactivos de alta afinidad y autoinmunidad.

Podríamos preguntarnos cómo es que esta serie de genes de la línea germinal está protegida de la deriva genética. Con una genoteca de alrededor de 390 genes *V, D* y *J* funcionales, la selección actuaría sólo débilmente en cualquier gen aislado que hubiera estado incapacitado desde el punto de vista funcional por la mutación; esto implica que una parte importante de la genoteca puede perderse antes de que actúen las fuerzas de la evolución. Una idea es que cada subfamilia de genes *V* relacionados contiene una codificación prototipo para un anticuerpo indispensable en la protección contra algún patógeno común, de modo que la mutación en este gen colocaría al huésped en situación de desventaja y, en consecuencia, no se lo seleccionaría. Si cualquiera de los otros genes íntimamente relacionados en su grupo se torna defectuoso por una mutación, este gen indispensable podría repararlos por conversión génica, mecanismo en el que –cabe recordar– dos genes interactúan de tal modo que la secuencia de nucleótidos de parte o de la totalidad de uno de ellos se vuelve idéntica a la del otro. Si bien la conversión génica ha sido invocada para explicar la diversificación de los genes del CMH, también puede actuar en otras familias de genes para mantener cierto grado de homogeneidad de la secuencia. Por cierto, es utilizado en gran medida, por ejemplo, por los pollos y los conejos para generar diversidad de inmunoglobulinas. En el conejo, un único gen V_H de la línea germinal es reordenado en la mayoría de las células B y es transformado luego en sustrato para la conversión génica por uno de los numerosos seudogenes V_H. En los seres humanos hay también grandes cantidades de seudogenes y genes huérfanos (genes localizados por fuera del locus génico, a menudo en un cromosoma completamente diferente) de V_H; en realidad éstos exceden en número a los genes funcionales, aunque hasta el presente no hay ningún dato de que sean utilizados en los procesos de conversión génica.

Receptores NK

Las células *natural killer* (NK) son una población de leucocitos que, como las células T y B, emplean receptores que pueden provocar su activación, cuyas consecuencias son la secreción de citocinas, más notablemente IFN-γ, y la provisión de señales a sus células diana por medio del ligando Fas o de gránulos citotóxicos capaces de destruir las células que proveen la señal de activación (Figuras 1.24 y 1.25; véase también el Videoclip 3).  Sin embargo, además de los **receptores NK activadores**, las células NK tienen receptores que pueden inhibir su función. Como veremos, los **receptores NK inhibidores** son fundamentales para el funcionamiento correcto de estas células porque estos receptores impiden que las células NK ataquen de modo indiscriminado los tejidos sanos del huésped. Es necesario insistir en esto por un momento porque se trata de una configuración bastante diferente a la que prevalece en las células T y B. Un linfocito T o uno B tienen un único tipo de receptor que reconoce el antígeno o no lo hace. Las células NK tienen dos tipos de receptores: receptores activadores que inducen la actividad citotóxica tras el reconocimiento de ligandos que no deben estar presentes en la célula diana y receptores inhibidores que limitan la muerte por NK mediante el reconocimiento de ligandos que deberían estar presentes. Así, la muerte por células NK puede ser activada por dos situaciones diferentes: la aparición de ligandos para los receptores activadores o la desaparición de los ligandos para los receptores inhibidores. Por supuesto, ambas situaciones pueden suceder a la vez, pero una es suficiente.

Ya hemos descrito con cierto detalle la muerte mediada por las células NK en el Capítulo 1 (p. 26), aquí nos centraremos en cómo estas células seleccionan sus objetivos como consecuencia de alteraciones en el patrón normal de expresión de las moléculas de superficie de la célula, como las **moléculas de clase I clásicas del CMH**, que pueden aparecer durante la infección viral. Las células NK también pueden atacar las células que tienen niveles de expresión normales de moléculas de clase I clásicas del CMH, pero tienen **moléculas relacionadas de clase I no clásicas del CMH** sobreexpresadas debido al estrés celular o al daño del DNA.

Las células NK expresan diversos receptores "integrados"

A diferencia de los receptores para el antígeno de los linfocitos T y B, los receptores de las células NK están "integrados" y no sufren recombinación VDJ para generar diversidad. Como consecuencia, la diversidad del receptor de la célula NK se logra a través de la duplicación y la divergencia del gen y, en este aspecto, se asemeja a los receptores de reconocimiento de patrón que describimos en el Capítulo 1. Así, los receptores NK son una mezcla confusa de moléculas estructuralmente dispares que comparten la propiedad funcional común de poder examinar las células respecto de los patrones normales de expresión de moléculas del CMH y moléculas del CMH relacionadas. Las células NK, a diferencia de las células T αβ no están **restringidas por el CMH**, en el sentido que no ven el antígeno sólo cuando son presentadas dentro de la hendidura de las moléculas de clase I

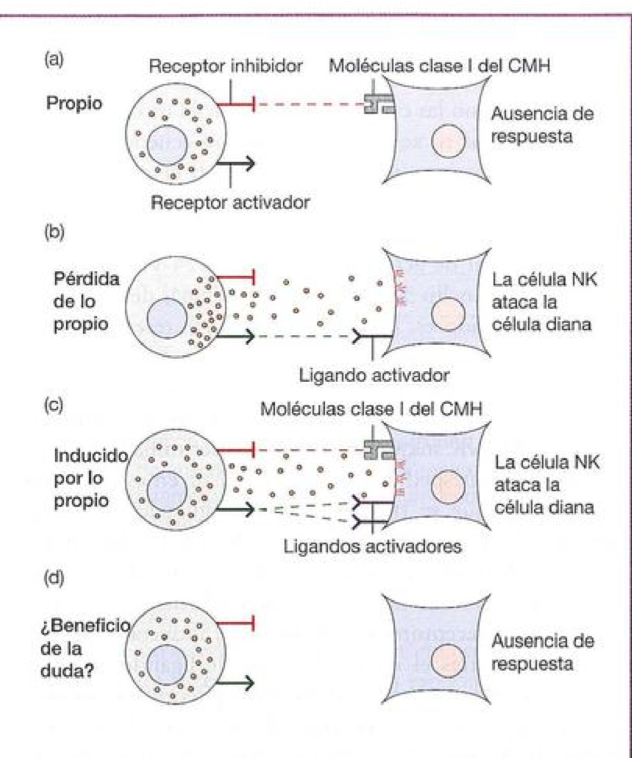


Figura 4.15. Muerte mediada por las células *natural killer* (NK) e hipótesis de la "pérdida de lo propio".

a) Tras el encuentro con una célula autóloga normal que expresa la molécula de clase I del CMH, los receptores NK inhibidores están ocupados y los receptores NK activadores permanecen desocupados porque no se expresa ningún ligando activador en la célula diana. La célula NK no se activa en esta situación. b) La pérdida de la expresión de moléculas de clase I del CMH ("pérdida de lo propio"), así como la expresión de uno o más ligandos para los receptores NK activadores, determinan el ataque celular mediado por los gránulos citotóxicos de la célula NK. c) Tras el encuentro con una célula diana que expresa moléculas de clase I del CMH, pero que también expresa uno o más ligandos para la activación de los receptores NK ("inducido por lo propio"), el resultado estará determinado por la fuerza relativa de las señales inhibidoras y activadoras recibidas por la célula NK. d) En algunos casos, las células no pueden expresar moléculas de clase I del CMH o ligandos activadores, y pueden ser ignoradas por las células NK debido tal vez a la expresión de ligandos alternativos para los receptores NK inhibidores.

o de clase II del CMH. Por el contrario, una de las funciones principales de las células NK es patrullar el cuerpo en busca de células que han perdido la expresión de las moléculas normalmente ubicuas de clase I del CMH, situación conocida como **pérdida del reconocimiento de lo propio** (Figura 4.15). Estas células anormales suelen ser malignas o están infectadas por un microorganismo, lo cual interfiere con la expresión de las moléculas de clase I.

Vimos en el Capítulo 1 que muchos patógenos activan receptores de reconocimiento de patrón (PRR) como receptores del tipo Toll que inducen los factores de transcripción regulados por interferón que dirigen la transcripción de los interferones de tipo I (IFNα e IFNβ). Los PRR, como TLR3, TLR7-9 y las helicasas de tipo RIG, que residen en los compartimentos intracelulares, están particularmente en sintonía para inducir la expresión de interferones de tipo I (véase Figura 1.7). De modo típico, estos PRR detectan moléculas largas de RNA monocatenario o bicatenario que suelen ser producidos por muchos virus. Una de las consecuencias posteriores de la secreción de interferón es el cese de la síntesis de proteína y la consiguiente regulación por disminución de, entre otras cosas, las moléculas de clase I del CMH. Así, la detección de patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP) de virus intracelulares u otros patógenos intracelulares puede hacer que esas células sean vulnerables al ataque mediado por células NK. ¿Cuál es exactamente el punto? Muchos patógenos intracelulares también interfieren de modo directo en la expresión o la exposición en la superficie de las moléculas de clase I del CMH como una estrategia para evadir la detección por las células T CD8-positivas que examinan estas moléculas para la presencia de péptidos no propios.

Debido a la función central de las moléculas de clase I del CMH en la presentación de péptidos provenientes de patógenos intracelulares al sistema inmunitario, resulta fácil comprender por qué pueden atraer la atención de virus u otros invitados no gratos que planean infiltrarse en sus huéspedes celulares. Por tal razón, es probable que las células NK se desarrollen junto con las células T restringidas por el CMH para asegurar que sean eliminados los patógenos u otras condiciones que pueden alterar la expresión de las moléculas de clase I del CMH y, por lo tanto, la presentación del antígeno a las células T αβ. Es probable que las células que terminan en esta posición infortunada se encuentren pronto bajo las garras de una célula NK activada. Este tipo de encuentro suele conducir a la muerte de la célula errante como resultado del ataque por los gránulos citotóxicos que contienen varias proteasas y otras enzimas destructivas liberadas por la célula NK activada.

Los receptores NK pueden ser activadores o inhibidores

Las células NK desempeñan una función importante en la batalla continua contra la infección viral y el desarrollo de tumores, y llevan a cabo su tarea mediante el uso de dos grupos de receptores: receptores activadores, que reconocen las moléculas que están sobreexpresadas en las células que sufren estrés o infectadas, y receptores inhibidores, que reconocen moléculas de clase I del CMH o moléculas relacionadas con el CMH que monitorizan la expresión correcta de moléculas de clase I del CMH. El equilibrio entre estímulos inhibidores y activadores determinará si se produce la destrucción mediada por células NK o no (Figura 4.15).

Se han identificado dos familias estructuralmente distintas de receptores NK: los **receptores de lectina tipo C (CTLR)** y **los receptores similares a Ig**. Ambos tipos comprenden receptores inhibidores y activadores (Cuadro 4.3). Los inhibidores contienen **ITIM** (***i*mmunoreceptor *t*yrosine-based *i*nhibitory *m*otifs; motivos de inhibición de inmunorreceptor basados en tirosina**) dentro de sus colas citoplasmáticas que ejercen una función inhibitoria dentro de la célula mediante el reclutamiento de fosfatasas, como **SHP-1**, que pueden antagonizar los procesos de transducción de señales que de otro modo conducirían a la liberación de gránulos citotóxicos o citocinas por las células NK

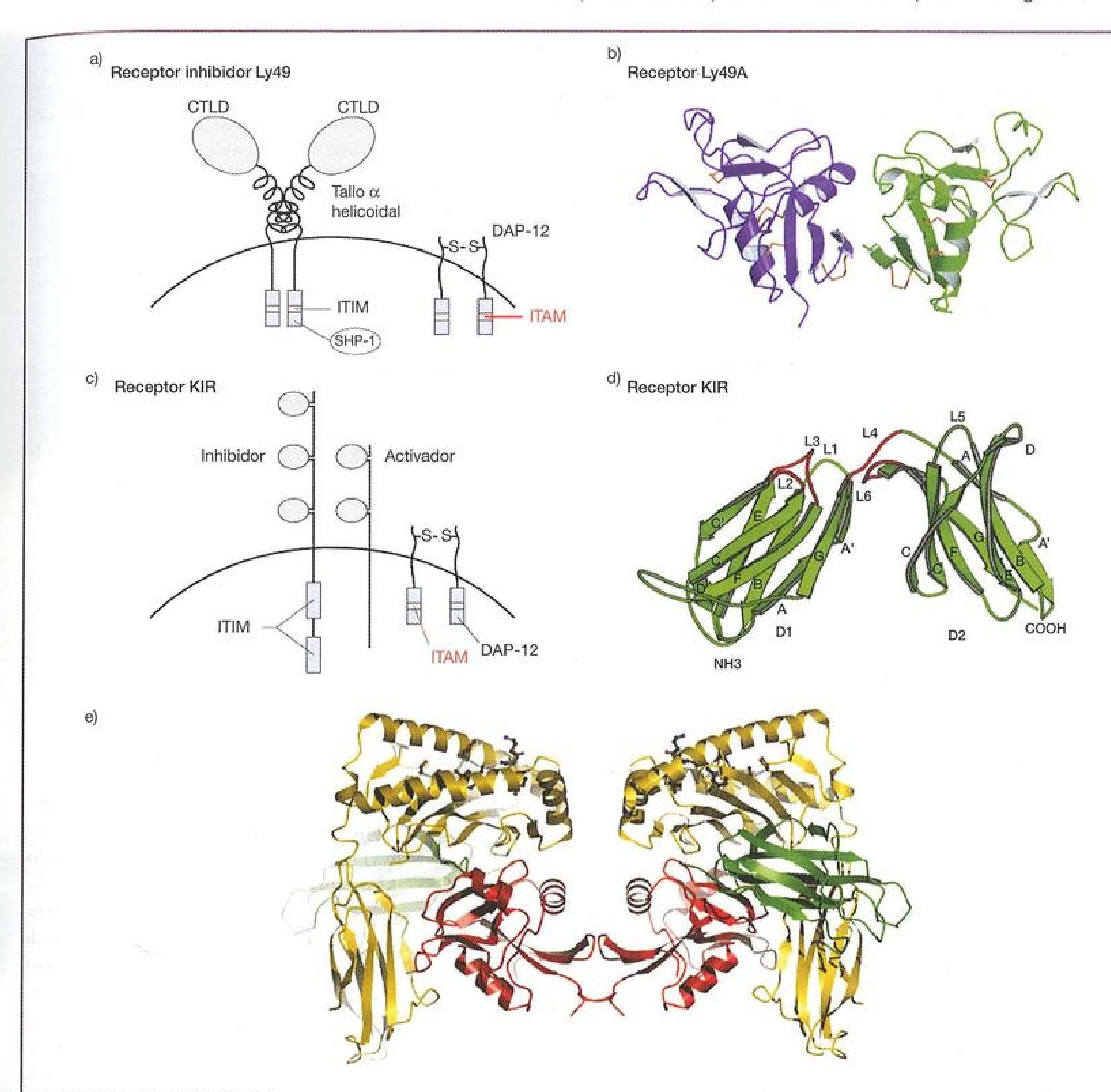


Figura 4.16. Receptores NK.

a) Representación esquemática de un receptor dimérico Ly49 inhibidor compuesto por dos dominios de lectina de tipo C (CTLD). Las colas citoplasmáticas de los receptores Ly49 inhibidores contienen los motivos de inhibición de inmunorreceptor basados en tirosina (ITIM) que pueden reclutar fosfatasas, como SHP-1, capaces de antagonizar la activación de NK. Los receptores Ly49 activadores carecen de ITIM y pueden asociarse con proteínas accesorias que contienen ITAM, como DAP-12, capaces de estimular la activación de las células NK. b) Dominio similar a lectina de tipo C de los receptores de células NK Ly49. La estructura tridimensional mostrada corresponde al Ly49A dimérico (código de entrada 1QO3 del banco de datos se proteínas); el monómero A se representa en azul y el monómero B figura en verde. Para más claridad, los elementos de la estructura secundaria hélices α, hebras β, enlaces disulfuro y terminaciones N y C sólo se indican en un monómero. (Cortesía del doctor Nazzareno Dimasi.) c) Los KIR humanos (receptores similares a inmunoglobulinas en las células *killer*) son equivalentes desde el punto de vista funcional a los receptores Ly49 murinos pero presentan una estructura diferente. Estos receptores contienen dos o tres dominios extracelulares de tipo Ig y también pueden ser inhibidores o activadores de acuerdo con la presencia de un motivo ITIM en sus dominios citoplasmáticos, como se muestra. Los receptores activadores pueden asociarse con el complejo accesorio DAP-12 que tiene ITAM para propagar las señales de activación en la célula NK, de lo cual resulta el ataque mediado por células NK. d) Estructura de los dominios extracelulares de tipo Ig (DI y D2) de un receptor KIR. (Cortesía del doctor Peter Sun y basado en diagramas originalmente publicados por Boyington y cols. [2000] *Nature* **405**, 537). e) Diagrama de cintas de la estructura cristalográfica del complejo Ly49C/H-2K^b. Ly49C, la cadena pesada H-2K^b y β_2-microglobulina (β_2M) aparecen en rojo, amarillo y verde, respectivamente. El péptido unido al CMH (gris) se representa como esferas y barras. (Cortesía del doctor Lu Deng y el profesor Roy A. Mariuzza).

(Figura 4.16). Por otra parte, los receptores activadores se asocian con proteínas adicionales, como **DAP-12,** que contienen ITAM y actúan positivamente dentro de sus colas citoplasmáticas y son capaces de estimular procesos que conducen al ataque mediado por las células NK. Tras el encuentro con sus ligandos cognados (las moléculas de clase I

Cuadro 4.3. Receptores activadores e inhibidores de las células natural killer (NK) en el ser humano. Este cuadro no es completo; algunos receptores no se incluyeron. Nótese que la familia de receptores *killer* similares a inmunoglobulinas (KIR) no se utiliza en el ratón, en cambio hay numerosos receptores de la familia Ly49.

Familia	Receptor	Ligando	Función
KIR	KIR2DL1	Grupo 2 HLA-C	Inhibidor
	KIR2DL2/3	Grupo 1 HLA-C	Inhibidor
	KIR2DL5	Desconocido	Inhibidor
	KIR3DL1	Bw4, HLA-B	Inhibidor
	KIR3DL2	HLA-A3/HLA-A11	Inhibidor
	KIR2DS1	Grupo 2 HLA-C	Activador
	KIR2DS2	Grupo 1 HLA-C	Activador
	KIR3DS1	Bw4. HLA-B	Activador
	KIR2DS3	Desconocido	Activador
	KIR2DS4	HLA-Cw4	Activador
	KIR2DS5	Desconocido	Activador
	KIR2DL4	HLA-G	Activador
Lectina de tipo C	CD94:NKG2A	HLA-E	Inhibidor
	NKR-P1 A	LLT1	Inhibidor
	CD94:NKG2C	HLA-E	Activador
	CD94:NKG2E	HLA-E	Activador
	NKG2D	MICA, MICB, ULBP	Activador
Citotoxicidad natural	NKp30	BAT-3	Activador
	NKp44	Hemaglutinina viral	Activador
	NKp48	Hemaglutinina viral	Activador
Otras	CD18	IgG	Activador
	ILT2	HLA-A, B, C, G	Inhibidor

del CMH), los receptores inhibidores suprimen las señales que de otro modo llevarían a la activación de la célula NK. Por consiguiente, las células que carecen de moléculas de clase I del CMH son incapaces de ocupar esos receptores inhibidores y tal vez sufran las consecuencias (Figura 4.15).

Los receptores NK son muy diversos y, como ésta es un área de investigación activa, daremos algunas generalizaciones necesarias.

Receptores Ly49

La clase principal de receptores que controlan las moléculas de clase I del CMH en el ratón está representada por la familia de receptores multigénicos Ly49 que contienen alrededor de 23 genes distintos: Ly49A a W. Estos receptores se expresan como homodímeros unidos por enlaces disulfuro, en los que cada monómero compuesto por un dominio de lectina tipo C se conecta con la membrana celular por medio de un tallo α-helicoidal de cerca de 40 aminoácidos (Figura 4.16a); cada célula NK expresa entre uno y cuatro genes Ly49 diferentes. Los receptores Ly49 individuales reconocen moléculas de clase I del CMH de un modo que, en la mayoría de los casos, es independiente del péptido de unión. Los dímeros de Ly49 toman contacto con las moléculas de clase I del CMH en dos sitios distintos que no se superponen de manera significativa con el sitio de unión al TCR en el CMH (Figura 4.16e).

Receptores similares a inmunoglobulinas en las células killer

Es de destacar que los seres humanos no utilizan receptores con Ly49 para llevar a cabo la misma tarea, pero en cambio emplean para este propósito un conjunto de receptores equivalentes desde el punto de vista funcional, pero con una estructura diferente: los **receptores similares a inmunoglobulinas en las células *killer*** (KIR; *killer cell immunoglobulin-like receptors*). Éste es un buen ejemplo de **evolución convergente**, en el que los genes no relacionados han evolucionado para cumplir el mismo papel funcional. Por el contrario, con el modo de unión al CMH desplegada por los receptores Ly49, los KIR se ponen en contacto con las moléculas de clase I del CMH en una orientación que se asemeja al modo de acoplamiento del TCR, en el que el contacto con el péptido de unión es parte de la interacción. Sin embargo, debe destacarse que aunque los KIR toman contacto con el péptido dentro de la hendidura de la molécula de clase I del CMH, estos receptores no distinguen entre los péptidos propios y los no propios, como lo hacen los TCR.

Receptores CD94/NKG2

Las células NK también utilizan miembros de la **familia de CD94/NKG2**, que pertenecen a la clase de receptores CTLR, presentes en los genomas de seres humanos, ratones y ratas. Los heterodímeros CD94/NKG2A, que son receptores inhibidores, pueden controlar de manera indirecta la expresión de proteínas de clase I del CMH mediante la interacción con una molécula invariable relacionada con el CMH, llamada HLA-E (seres humanos) y $Qa1^b$ (ratones), cuya expresión de superficie depende de la síntesis adecuada de las proteínas principales de moléculas de clases I A, B y C del CMH, que se analizarán con mayor detalle a continuación. Si se detectan concentraciones normales de HLA-E, los receptores inhibidores suprimirán el ataque de

las células NK. Los heterodímeros CD94/NKG2 se expresan en la mayoría de las células NK, así como en las células T $\gamma\delta$.

Este sistema de receptores controla indirectamente la expresión de moléculas de clase I del CMH de una manera bastante ingeniosa. Las moléculas relacionadas con la clase I del CMH HLA-E/$Qa1^b$ son notables por el hecho de que ellas unen principalmente péptidos invariables que se encuentran en las secuencias líder (aminoácidos 3-11) de las moléculas clásicas de clases I A, B y C del CMH. Ante la ausencia de secuencias líder de estos péptidos, HLA-E y $Qa1^b$ no se expresan en la superficie celular y, por esto, se desencadena el ataque de NK. Dado que muchos agentes microbianos, en particular los virus, antagonizan la expresión de moléculas de clase I del CMH, controlan el nivel de expresión de estas moléculas; esto es una manera ordenada de detectar indirectamente que no todo está bien.

Otro miembro de esta familia de receptores, NKG2D, no se asocia con CD94 y en su lugar forma homodímeros NKG2D/NKG2D, que son receptores activadores. Los homodímeros NKG2D reconocen las proteínas relacionadas con el CMH, **cadena A relacionada con la cadena de clase I del CMH** (MICA) y el **MICB** relacionado, así como las proteínas de unión ULI6 en seres humanos y las proteínas homólogas H60/RAE-1/MULT-1 en ratones. Estos ligandos están sobreexpresados en las células dañadas o que sufren estrés, como se detalla a continuación.

Receptores de citotoxicidad natural

Otros receptores NK, que pertenecen a la clase similar a la Ig, son los de **citotoxicidad natural**, que incluyen NKp30, NKp44 y NKp46, todos receptores activadores. Aún no se conocen con certeza los ligandos para estos receptores, pero hay cierta evidencia de que pueden detectar ciertos productos virales, como la hemaglutinina del virus de influenza o del virus Sendai, y también pueden ser sensibles a patrones alterados de heparansulfato en las superficies de tumores. El BAT-3 (transcrito 3 asociado al HLA-B), una proteína que ha sido implicada en las vías de respuesta al daño del DNA, recientemente también se lo implicó como ligando para NKp30.

Receptores Fc CD16

Otro ejemplo de un receptor NK activador es el CD16, el receptor Fc de baja afinidad para IgG que determina la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA, véase p. 48). En este caso, el ligando del receptor es la IgG unida al antígeno presente en una célula diana, que es claramente una situación anormal.

Las respuestas al estrés celular y el daño del DNA pueden activar las células NK

El estrés celular, como el choque térmico, también es tema de preocupación para las células del sistema inmunitario porque además puede ser causado por infección o, alternativamente, estas células pueden estar sufriendo transformación maligna. El sistema HLA-E/Qa1, que como se describió antes está implicado en el control de la expresión continua de las proteínas de clase I del CMH, también participa en atraer la atención de las células NK en el contexto del estrés celular. En respuesta a las diversas formas de estrés celular se inducen las proteínas del choque térmico, como HSP-60, y los péptidos derivados del péptido líder HSP-60 pueden desplazar los péptidos derivados de las moléculas de clase I del CMH de la hendidura de unión al péptido HLA-E. Si bien los complejos peptídicos HLA-E/HSP-60 son movilizados hacia la superficie celular, ya no son reconocidos por los heterodímeros CD94/NKG2, lo que da por resultado la activación de las células NK debido a la "pérdida de lo propio".

Además de reconocer la "pérdida de lo propio", las células NK también utilizan sus receptores para reconocer directamente los componentes del patógeno o las proteínas similares a la clase I del CMH, como MICA y MICB, que suelen expresarse de manera deficiente en las células sanas normales. MICA y los ligandos relacionados tienen un patrón de expresión complejo, pero a menudo están sobreexpresados en las células transformadas o infectadas, y esto puede ser suficiente para activar los receptores NK que son capaces de proporcionar señales de activación; un fenómeno que se ha denominado **reconocimiento "inducido por lo propio"** (Figura 4.15). Una vez unidos, la indicación de los receptores activadores a la célula NK es destruir la célula diana, secretar citocinas o ambas actividades. Esta situación potencialmente anárquica, por la cual las células NK atacarían a todas las células del cuerpo, es prevenida en condiciones normales por el reconocimiento de las moléculas de clase I del CMH por los receptores inhibidores. Así, los patrones normales de expresión de las moléculas de clase I del CMH suprimen la muerte por NK, mientras que la presencia de patrones anormales de moléculas propias induce la activación de NK. Es precisamente la intensidad relativa de estas señales la que determina si se producirá el ataque.

Estudios recientes también sugieren que las cinasas de control, como Chk1 (*checkpoint kinases*), que participan en la **respuesta del daño del DNA**, pueden inducir la expresión de varios de los ligandos activadores del receptor NKG2D cuando la célula recibe radiación Áo después del tratamiento con fármacos perjudiciales para el DNA. Esto sugiere que las células que han sufrido daño del DNA, además de activar su maquinaria de reparación del DNA, pueden sobreexpresar los ligandos del receptor NK para alertar al sistema inmunitario. Esto tiene un sentido perfecto dado que estas células son peligrosas porque tienen el potencial de escapar a los controles del crecimiento normal debido a la reparación defectuosa o incompleta del DNA. En realidad, se considera que la vigilancia tumoral es una de las funciones principales de las células NK, un tema que se analizará de nuevo en el Capítulo 17.

Complejo mayor de histocompatibilidad (CMH)

Las moléculas de este complejo fueron definidas en un comienzo por su capacidad de provocar el rechazo vigoroso de injertos entre diferentes miembros de una especie (Avances y descubrimientos 4.2). Ya se mencionó la necesidad de los antígenos de estar asociados con las moléculas de

Avances y descubrimientos 4-2—Complejo mayor de histocompatibilidad (CMH)

Peter Gorer elaboró antisueros de conejo contra eritrocitos provenientes de una cepa pura de ratones (como resultado de más de 20 apareamientos entre hermanos), y por la cuidadosa absorción cruzada con eritrocitos de diferentes cepas, identificó el antígeno II específico de cepa, conocido en la actualidad como H-2 (Cuadro H4.2.1).

A continuación demostró que el rechazo de un tumor albino (A) por ratones negros (C57) estaba íntimamente relacionado con la presencia del antígeno II (Cuadro H4.2.2) y que el rechazo del tumor se asociaba con el desarrollo de anticuerpos contra este antígeno.

Con posterioridad, George Snell introdujo el término antígeno de **histocompatibilidad (H)** para describir los antígenos que provocan el rechazo del injerto y demostró que, de todos los antígenos H potenciales, las diferencias en el locus H-2 (es decir, antígeno II) provocaba el rechazo de injerto más intenso observado entre diversas cepas de ratones. De a poco, los esmerados estudios fueron revelando una situación sumamente intrincada. Lejos de representar un solo locus génico, H-2 demostró ser un gran complejo de múltiples genes, muchos de los cuales eran altamente polimorfos; de ahí el término **complejo mayor de histocompatibilidad (CMH)**. Los componentes principales de los actuales mapas genéticos del HLA humano y el H-2 murino del CMH se muestran en la Figura A4.2.1 para dar al lector una idea general de la organización compleja de esta importante región (¡para los inmunólogos, queremos decir!, porque todas las regiones altamente transcritas de alguna manera son importantes para el huésped).

Cuadro H4.2.1. Identificación de H-2 (antígeno II).

Antisuero de conejo contra:	Antígenos detectados sobre eritrocitos albino		
	I	II	III
Albino (A)	+++	+++	++
Negro (C57)	++	–	++

Cuadro H4.2.2. Relación de antígenos II con el rechazo tumoral.

Fenotipo del antígeno II de la cepa receptora	Rechazo del inóculo del tumor (cepa A) por:			
	* Cepa pura		**(A x 057) F1 retrocruzado con C57	
	–	+	–	+
Ag II +ve (A)	39	0	17(19,3)	17(19,5)
Ag II -ve (C57)	0	45	0	44 (39)

* Un inóculo de tumor proveniente de una cepa A con el antígeno II es rechazado por el huésped C57 (+ = rechazo; – = aceptación).
** La descendencia de apareamiento A × C57 fue retrocruzada con el progenitor C57, y en la descendencia resultante se investigó el antígeno II (Ag II) y su capacidad de rechazar el tumor. Las cifras entre paréntesis = número esperado si el crecimiento del tumor es influenciado por dos genes dominantes, uno de los cuales determina la presencia de antígeno II.

Humano	Clase del CMH	II			III				I			Cromosoma 6
	HLA	DP	DQ	DR	C´	HSP	TNF	etc.	B	C	A	

Ratón	Clase del CMH	I	II		III				I		Cromosoma 17
	H-2	K	A	E	C´	HSP	TNF	etc.	D	L	

Figura A4.2.1. Principales regiones genéticas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).

clase I o de clase II del CMH para que puedan ser reconocidos por los linfocitos T (Figura 4.8). El modo en que son procesados y seleccionados los péptidos antigénicos para la presentación dentro de las moléculas del CMH y cómo el TCR detecta este complejo se describen en detalle en el Capítulo 5, pero analizaremos brevemente aquí los puntos principales para que el lector comprenda por qué estas moléculas son de suma importancia en el sistema inmunitario.

Las moléculas del CMH se ensamblan dentro de la célula donde se asocian con fragmentos peptídicos cortos derivados de las proteínas que se están formando en la célula (moléculas de clase I del CMH unidas a péptidos provenientes de las proteínas que se están sintetizando dentro de la célula) o de proteínas que han sido internalizadas por la célula a través de la fagocitosis o la pinocitosis (moléculas de clase II del CMH unidas a péptidos provenientes de proteínas formadas fuera de la célula). Hay algunas excepciones a estas reglas generales, que se tratarán en el Capítulo 5. Ya hemos hecho la analogía de que este proceso representa un tipo de sistema de verificación para el "control de calidad" donde una fracción de proteínas presentes en la célula en un momento determinado es presentada a las células T para su inspección a fin de asegurar que ninguna de ellas proviene de lo no propio. Naturalmente, si por casualidad una célula alberga un péptido no propio, queremos que el sistema inmunitario conozca esto lo antes posible para que pueda adoptar las medidas adecuadas. Así, las moléculas de clase I del CMH presentan péptidos que son propios o que se están formando por un virus o una bacteria intracelular. Las moléculas de clase II del CMH presentan péptidos que son proteínas propias extracelulares o proteínas que se forman por microorganismos extracelulares. El sentido es permitir que una célula T inspeccione lo que está sucediendo, desde el punto de vista antigénico, dentro de la célula.

Como veremos, las moléculas de clase I del CMH cumplen la importante función de presentar los péptidos para la

inspección por las células T CD8 que están preocupadas, sobre todo, por encontrar células infectadas por un virus o "anormales" para destruirlas. La célula T CD8 que tiene un receptor TCR reconoce una combinación péptido-molécula de clase I del CMH que "encaja" bien en su TCR, la ataca y mata a esa célula. Por otra parte, las moléculas de clase II del CMH no se expresan en la población general de células sino que están restringidas a las células del sistema inmunitario, como las células dendríticas, que tienen una función de presentación de antígeno, como se señaló en el Capítulo 1. Tras el reconocimiento de una combinación adecuada de moléculas de clase II del CMH-péptido por un linfocito T CD4, se produce la activación de este último y la maduración a una célula T efectora que puede ayudar a las células B para formar anticuerpos, por ejemplo. A pesar de que esto es una simplificación excesiva, como veremos en capítulos posteriores, por favor tenga en cuenta la idea general de que las moléculas de clase I y II del CMH presentan péptidos a las células T restringidas a CD8 y CD4, respectivamente, para el propósito de permitir que estas células determinen si deberían convertirse en "activadas" y diferenciarse a células efectoras. Ahora analicemos estas moléculas con mayor detalle.

Las moléculas de clase I y de clase II son heterodímeros unidos a la membrana

Moléculas de clase I del CMH

Las moléculas de **clase I** están constituidas por una cadena polipeptídica pesada, de 44 kDa, unida de manera no covalente a un polipéptido más pequeño de 12 kDa denominado **β_2-microglobulina**. La fracción más grande de la cadena pesada se halla organizada en tres dominios globulares (α_1, β_2 y α_3; Figura 4.17) que sobresalen de la superficie celular; una porción hidrófoba fija la molécula en la membrana y una secuencia hidrófila corta lleva el extremo C-terminal al interior del citoplasma.

El análisis cristalográfico con rayos X de una molécula de clase I de origen humano proporcionó un adelanto significativo en nuestro conocimiento acerca de la función del CMH. Tanto la β_2-microglobulina como la región α_3 se asemejan a los dominios de la Ig clásica en lo que respecta a sus patrones de plegamiento (véase Figura 4.17c). Sin embargo, los dominios α_1 y α_2, más distales a la membrana, forman dos hélices α extendidas sobre un piso creado por hebras mantenidas juntas en una hoja plegada β donde el todo forma una **hendidura** bien definida (Figura 4.17b y c). El aspecto de estos dominios es demasiado llamativo, y nosotros dudamos de que el lector necesite la ayuda de analogías gastronómicas como "dos salchichas en un asador" para evitar cualquier olvido acerca de la estructura de la molécula de clase I. Surgió otra característica curiosa. La hendidura estaba ocupada por una molécula lineal, que ahora se sabe que es un péptido cocristalizable con la proteína clase I (Figura 4.18).

Moléculas de clase II del CMH

Las **moléculas de clase II del CMH** también son glucoproteínas transmembrana, constituidas en este caso por cadenas polipeptídicas α y β de 34 kDa y 29 kDa de peso molecular, respectivamente.

Existe una homología considerable en las secuencias con las moléculas de la clase I; los estudios estructurales demostraron que los dominios α_2 y β_2, los más cercanos a la membrana celular, adoptan el plegamiento característico de las Ig, mientras que los dominios α_1 y β_1 se asemejan a los α_1 y α_2 de la clase I en cuanto a la formación de una hendidura limitada por dos hélices α y un piso de hoja plegada β (Figuras 4.17a y 4.18).

En la Figura 4.19 se muestran la organización de los genes que codifican la cadena α de la molécula de clase II del HLA-DR humano y las principales secuencias reguladoras que controlan su transcripción.

Las moléculas de clase I y de clase II del CMH son poligénicas

La mayoría de las células expresa varios tipos de proteínas de clase I y de clase II del CMH. Hay tres genes diferentes de la cadena α de la clase I, denominados *HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-C* en los seres humanos y *H-2K*, *H-2D* y *H-2L* en los ratones, que pueden producir la expresión al menos de tres proteínas distintas de clase I en cada célula. Este número se duplica si el individuo es **heterocigoto** para los alelos de clase I expresados en cada locus; en realidad, y como veremos más adelante en este capítulo, esto es lo que suele suceder debido a la naturaleza **polimorfa** de los genes de clase I.

Hay también tres tipos diferentes de genes de la cadena α y β de las moléculas de clase II del CMH expresados en los seres humanos, *HLA-DQ*, *HLADP* y *HLA-DR*, y dos pares en los ratones, *H2-A (IA)* y *H2-E (I-E)*. De tal modo, los seres humanos pueden expresar un mínimo de tres moléculas diferentes de clase II, cantidad que aumenta de manera significativa cuando se consideran los polimorfismos; esto se debe a que pueden generarse diferentes combinaciones de la cadena α y β cuando un individuo es heterocigoto para un gen particular de clase II.

Los tipos diferentes de moléculas de clase I y de clase II muestran la misma estructura básica, como se ilustra en la Figura 4.17a, y todos participan en la presentación de péptidos a las células T pero, debido a las diferencias significativas en sus hendiduras de unión al péptido, **cada una presenta un espectro diferente de péptidos** al sistema inmunitario. Esto tiene el efecto muy deseable de reducir la probabilidad de que los péptidos provenientes de proteínas del patógeno fallen en ser presentados.

Es probable que las moléculas de clase I y de clase II del CMH hayan evolucionado a partir de un único gen ancestral que sufrió duplicaciones seriadas, seguidas de la diversificación como consecuencia de la presión selectiva, para generar los diferentes genes de la clase I y la clase II que conocemos en la actualidad (Figura 4.20). Los genes que no confirieron alguna ventaja selectiva o que sufrieron mutaciones deletéreas fueron eliminados del genoma o aún pueden quedar presentes como seudogenes (genes que no expresan una proteína funcional); en realidad, muchos seudogenes están presentes dentro de la región del CMH. Este tipo de modelo de evolución génica se ha denominado **modelo de nacimiento y muerte** o del acordeón, debido al modo en que esta región del gen se expandió y acortó durante la evolución.

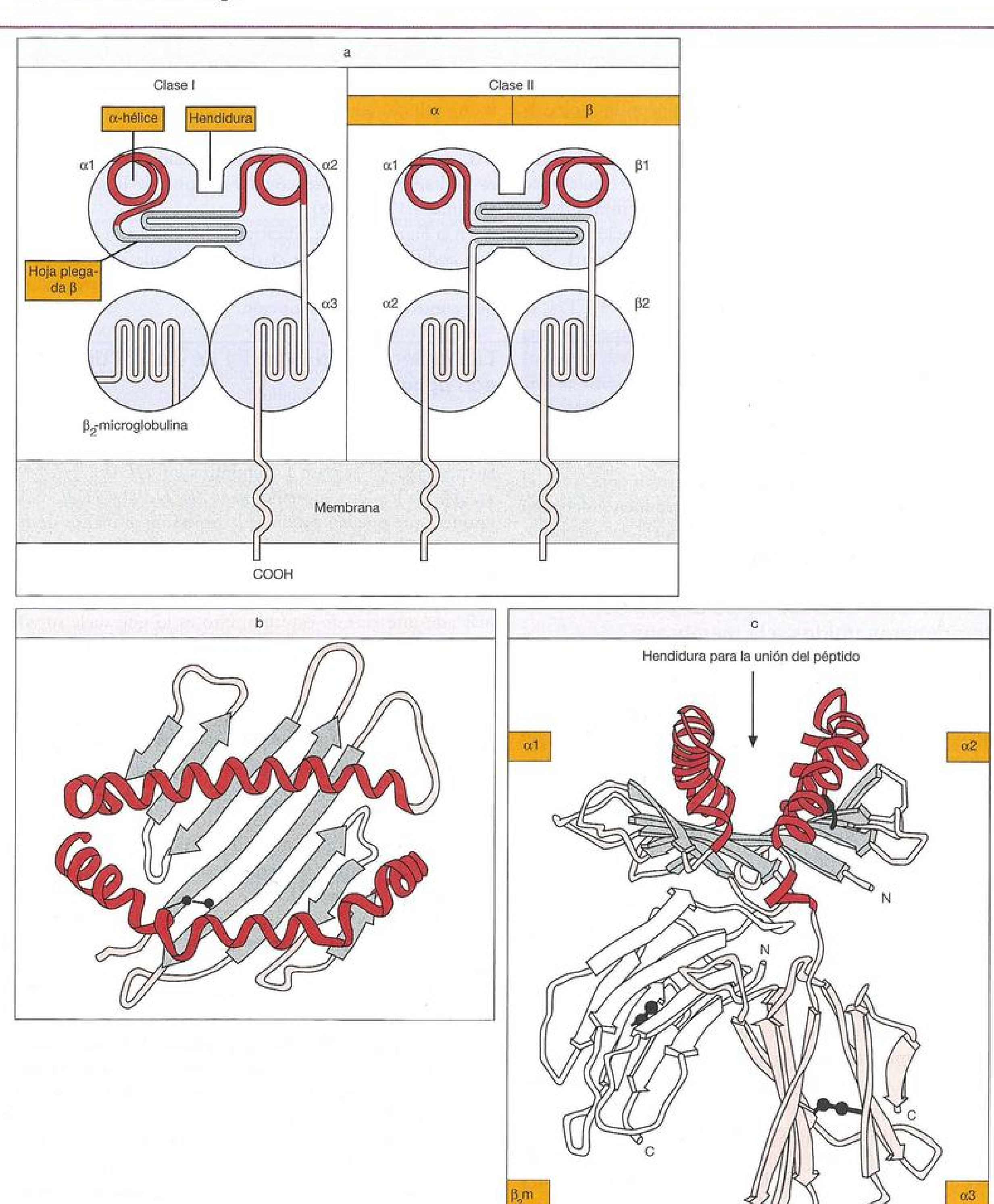


Figura 4.17. Moléculas de clase I y clase II del CMH.

a) Diagrama que muestra los dominios y los segmentos transmembrana; las hélices α y las hojas plegadas β se observan en la parte superior. b) Representación esquemática general de la superficie superior de una molécula de clase I humana (HLA-A2) basada en la estructura cristalográfica con rayos X. Las hebras que forman la hoja plegada β aparecen como flechas grises gruesas en la dirección amino a carboxilo; las hélices α están representadas como cintas helicoidales rojas. Las superficies que se enfrentan por dentro de las dos hélices y la superficie superior de la hoja β forman una hendidura. Los dos círculos negros representan un puente disulfuro intracatenario. c) Vista lateral de la misma molécula que muestra con claridad la anatomía de la hendidura y el plegamiento típico tipo Ig de los dominios α3 y β2-microglobulina (cuatro hebras β antiparalelas en una cara y tres en la otra). (Reproducido de Bjorkman P.J. y cols. [1987] *Nature* **329**,506, con autorización).

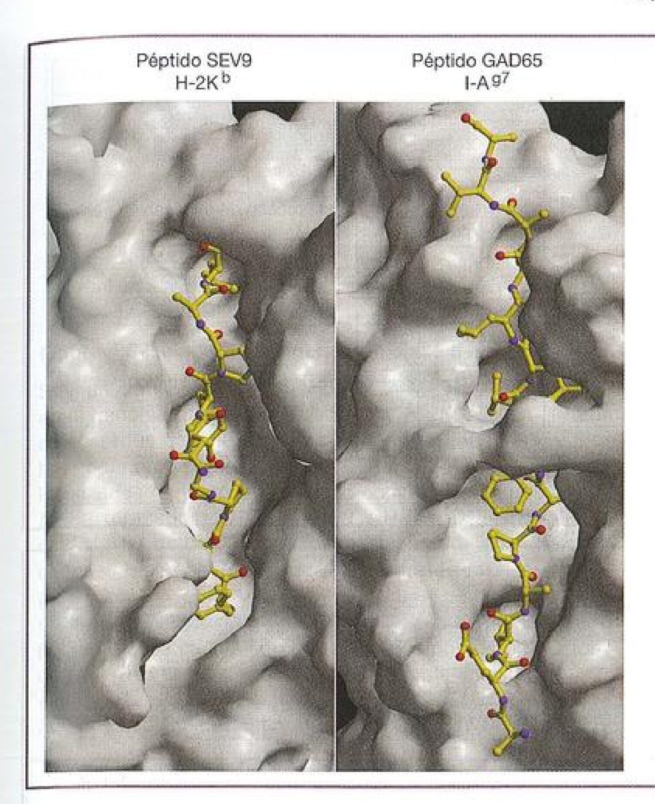


Figura 4.18. Imagen de la superficie de las moléculas de clase I y clase II del CMH del ratón en complejo con el péptido.

Zonas de la superficie de la molécula de clase I de ratón (H-2K^b), accesibles por medio de solventes, que forma un complejo con el péptido proveniente de un virus y la molécula de clase II de ratón I-A^{g7} que forma un complejo con un péptido endógeno. Las imágenes mostradas aquí son similares al esquema de la figura 4.17b y miran hacia abajo en la superficie de las moléculas del CMH. Obsérvese que la hendidura de unión al péptido de clase I es más reducida que la de las moléculas de clase II, con el resultado de que los péptidos de unión de clase I suelen ser más cortos que los que se unen a las moléculas de clase II. (Cortesía de los doctores Robyn Stanfield y Ian Wilson, Departamento de Biología Molecular, The Scripps Research Institute, La Jolla, California, Estados Unidos).

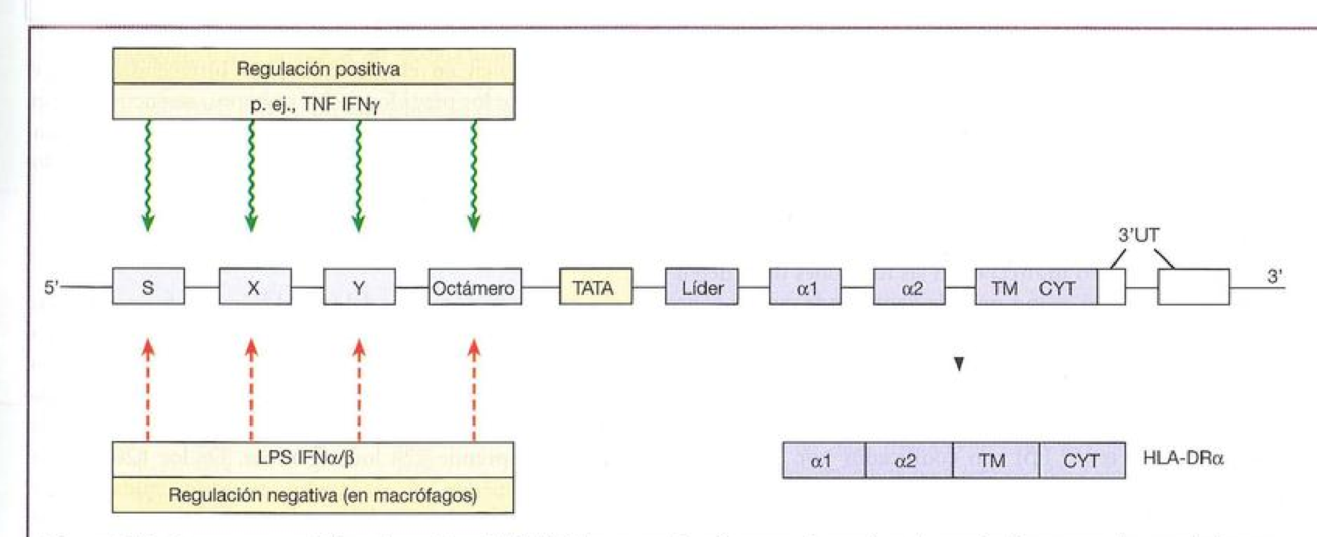
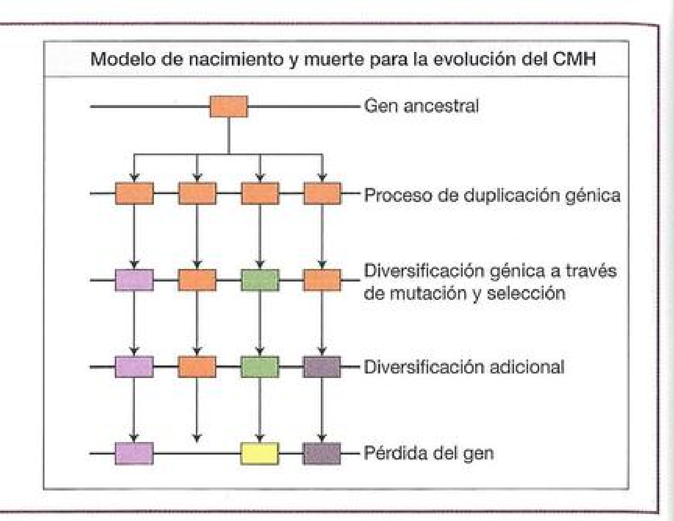


Figura 4.19. Genes que codifican la cadena HLA-DRαhumana (azul) y sus elementos de control (secuencias reguladoras en celeste y promotor de la caja TATA en amarillo).

α_1/α_2 codifican los dos dominios extracelulares; TM y CYT codifican los segmentos transmembrana y citoplasmático, respectivamente. 3'UT representa la secuencia 3' no traducida. Los motivos octaméricos también se encuentran en casi todos los promotores del gen *V* de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina (véase Figura 3.21) y en los promotores de otros genes específicos de células B como *B29* y *CD20*.

Figura 4.20. Modelo de nacimiento y muerte de la evolución del CMH.

Lo más probable es que los diferentes genes del CMH se hayan originado a través de procesos de duplicación que dieron por resultado la diversificación de genes duplicados como consecuencia de la presión selectiva. Los genes que no confieren ventaja selectiva pueden sufrir mutaciones deletéreas, con la producción de seudogenes, o ser eliminados del genoma. Los ambientes diferentes imponen presiones selectivas distintas debidas, por ejemplo, a otros patógenos, y dan como resultado un grado alto de polimorfismo dentro de esta familia génica. El polimorfismo del CMH se observa sobre todo dentro de las regiones de unión al péptido de las moléculas de clase I y II del CMH.



Ser humano	Gen HLA	*MICB*	*MICA*	*B*	*C*	*E*	*A*	*G*	*F*
	Producto génico	MICB	MICA	HLA-B	HLA-C	HLA-E	HLA-A	HLA-G	HLA-F

Ratón	Gen H-2	*TAPASINA*	*K*	*D*	*L*	*Q*	*T*	*M*
	Producto génico	TAPASINA	H-2K	H-2D	H-2L	Q	T	H-2M

Figura 4.21. Mapa de los genes de clase I del CMH.

Los genes polimorfos de clase I "clásicos", *HLA-A, HLA-B, HLA-C* en los seres humanos y *H-2K, H-2D, H-2L* en los ratones, se destacan con un sombreado de color anaranjado y codifican cadenas peptídicas que, junto con la β2-microglobulina, forman las moléculas de clase I completas, identificadas originalmente en los estudios iniciales como antígenos por los anticuerpos que inducen en los injertos en otro miembro de la misma especie. Obsérvese que sólo algunas cepas de ratones tienen un gen *H-2L*. Los genes que se expresan de modo más abundante son *HLA-A* y *HLA-B* en los seres humanos y *H-2K* y *H-2D* en el ratón. Los otros genes de clase I ("clase Ib") son denominados "no clásicos" o "relacionados con la cadena de clase I". Son oligomorfos más que polimorfos o a veces invariables, y muchos son silentes o seudogenes. En el ratón hay alrededor de 15 genes *Q* (denominados también *Qa*), 25 genes *T* (denominados también *TL* o *Tla*) y 10 genes *M*. MICA y MICB son ligandos para los receptores de las células NK. La tapasina está comprometida en el transporte de péptidos. El gen que codifica esta molécula se halla en el extremo centromérico de la región CMH y por consiguiente se muestra en este mapa génico con respecto al ratón, pero en la Figura 4.22 se representa el mapa génico de la clase II respecto del ser humano (véase la Figura A4.2.1 para comprender la razón).

Diversos genes relacionados con la respuesta inmunitaria contribuyen a la región de clase III restante del CMH

Otros genes que se congregan dentro de la región CMH del cromosoma son agrupados bajo el título de clase III. En un sentido amplio, podría decirse que muchos se relacionan de manera directa o indirecta con las funciones de la defensa inmunitaria. Un grupo notable comprende cuatro genes que codifican componentes del complemento, dos de los cuales son para la fracción C4 isotipos C4A y C4B, y los otros dos para C2 y factor B. Las citocinas, el factor de necrosis tumoral (TNF, a veces denominado TNFα) y la linfotoxina (LTα y LTβ) son codificados por la clase III, como también los tres miembros de las proteínas de choque térmico de origen humano de 70 kDa. Como siempre, las cosas realmente no encajan en las delicadas cajas pequeñas en las que nos gustaría colocarlas. Aunque fueran de cristal transparente donde una región del CMH acaba y otra comienza (y no lo es), algunos genes localizados en la mitad de las regiones de clases I o II "clásicas" (véase Figura 4.21) deberían clasificarse de modo más correcto como parte de la población de clase III. Por ejemplo, los genes *LMP* y *TAP* que intervienen en el procesamiento intracelular y en el transporte de los péptidos de los epítopos, se encuentran en la región de la clase II (véase más adelante), pero no presentan la clásica estructura de esta clase ni están expresados sobre la superficie celular.

Mapa génico del CMH

La secuencia completa del CMH humano fue publicada a fines del último milenio después de un enorme esfuerzo conjunto de grupos de investigación de Inglaterra, Francia, Japón y los Estados Unidos. La secuencia completa, que representa un compuesto de haplotipos diferentes del CMH, comprende 224 locus génicos. De los 128 de estos genes que pueden ser expresados, se estima que cerca del 40% tienen funciones relacionadas con el sistema inmunitario. No está claro por qué muchos genes relacionados con la respuesta inmunitaria se reúnen dentro de esta región relativamente pequeña, aunque el fenómeno también se ha observado con los genes "de mantenimiento celular" (o *housekeeping*) que comparten funciones relacionadas. Como la localización de un gen dentro de la cromatina puede influir profundamente en su actividad transcripcional, quizá cum-

SER HUMANO																
	GEN HLA	TAPASINA	DPB	DPA	DOA	DMA	DMB	LMP2	TAP I	LMP7	TAP2	DOB	DQB	DQA	DRB	DRA
	PRODUCTO GÉNICO	TAPASINA	DPβ	DPα	DOα	DMα	DMβ	Complejo proteosómico		Péptido transportador		DOβ	DQβ	DQα	DRβ	DRα
			HLA-DP		HLA-DO	HLA-DM						HLA-DO	HLA-DQ		HLA-DR	

Ratón														
	Gen H-2	Oa	Ma	Mb2	Mb1	LMP2	TAP2	LMP7	TAP 1	Ob	Ab	Aa	Eb	Ea
	Producto génico	Oα	DMα	DMβ2	DMβ1	Complejo proteosómico		Péptido transportador		β	Aβ	Aα	Eβ	Eα
		H-2O	H-2DM							H-2O	H-2A		H-2E	

Figura 4.22. Mapa de los genes de clase II del CMH.

Se muestran los genes "clásicos" *HLA-DP, HLA-DQ* y *HLA-DR* en el genoma humano y *H-2A (I-A)* y *H-2E (I-E)* en el ratón sombreados de color más oscuro. Ambas cadenas α y β de heterodímeros de clase II son transcritas a partir de genes localizados muy próximos. Por lo común existen dos genes *DRB* expresados: *DRB1* y *DRB3, DRB4* o *DRB5*. Una situación similar de una única cadena α apareada con diferentes cadenas β se encuentra en la molécula I-E del ratón. Los genes *LMP2* y *LMP7* codifican parte del complejo proteosómico que escinde las proteínas citosólicas en péptidos más pequeños, los cuales son transportados por los productos del gen *TAP* al interior del retículo endoplasmático. *HLA-DAM* y *HLA-DMB* (en el ratón *H-2DMa, H-2DMb1* y *H-2DMb2*) codifican el heterodímero DM αβ, que elimina la cadena invariable asociada a la de clase II (CLIP) de las moléculas de clase II clásicas para permitir la unión de los péptidos de alta afinidad. Las moléculas H-2DM del ratón a menudo se denominan H-2MI y H-2M2, aunque ésta es una designación que se presta a confusión porque el término *H-2M* también se utiliza para un conjunto completamente diferente de genes distales a la región *H-2T* y codifican a los miembros de la familia de la clase Ib (véase Figura 4.21). Los genes *HLA-DOA* (denominados en forma alternativa *HLA-DNA*) y *HLA-DOB* (*H-2Oa* y *H-2Ob* en el ratón) también codifican un heterodímero αβ que puede intervenir en la selección o el intercambio del péptido con las moléculas de clase II clásicas. (Reproducido con autorización de *Nature Reviews Immunology* [2004] **5**, 889-899).

Ser humano	*CYP21B*	*C4B*	*CYP21A*	*C4A*	*BF*	*C2*	*HSPA1B*	*HSPAIA*	*HSPAIL*	*LTB*	*TNF*	*LTA*
Ratón	*CYP21A1*	*C4*	*CYP21A2*	*Sp*	*BF*	*C2*	*HSP70 1*	*HSP70 3*	*Hsc70t*	*LTB*	*TNF*	*LTA*

Figura 4.23. Mapa de los genes de clase III del CMH.

Esta región es una especie de "cajón de sastre". Aparte de los productos inmunológicamente "respetables" como C2, C4, factor B (codificado por el gen *BF*), factor de necrosis tumoral (TNF), linfotoxina α y linfotoxina β (codificadas por *LTA* y *LTB*, respectivamente) y tres proteínas de choque térmico de 70 kDa (los genes *HSPA1A, HSPA1B* y *HSPA1L* en los seres humanos, *HSP70-1, HSP70-3* y los genes de *Hsc70t* en el ratón), genes no mostrados en la figura pero presentes en este locus son los que codifican la valil-tRNA sintetasa (*G7a*), NOTCH4, que tiene varias actividades reguladoras, y tenascina, una proteína de la matriz extracelular. En realidad, muchos genes pueden haber sido llevados a esta localización durante el largo pasaje de la evolución sin que necesariamente tengan que actuar en acuerdo con sus vecinos para desarrollar alguna función defensiva integrada. Las 21-hidroxilasas (21OHA y B, codificadas por *CYP21A* y *CYP21B*, respectivamente) están vinculadas con la hidroxilación de esteroides como la cortisona. El gen *Slp* (*sex limited protein*, proteína limitada al sexo) codifica un alelo murino de C4, expresado bajo la influencia de la testosterona.

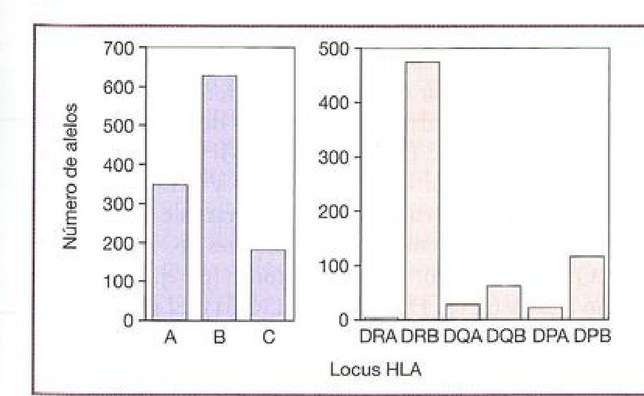


Figura 4.24. Polimorfismo dentro de los genes de clase I y de clase II del HLA humano.

Número de alelos de clase I distintos del HLA humano (A, B, C) y de clase II (DRA, DRB, DQA, DQB, DPA, DPB) en cada locus desde enero de 2005. (Basado en datos recogidos por el Comité de Nomenclatura para factores del sistema HLA de la OMS publicado en el artículo de Marsh y cols. [2005] *Tissue Antigens* **65**, 301).

pla alguna función para asegurar que se expresen en niveles similares los genes de esta región. Los genes encontrados dentro de las regiones condensadas de cromatina a menudo se expresan en niveles relativamente bajos y, en algunos casos, no pueden ser expresados en absoluto. La región entre las clases II y I en el mapa humano contiene alrededor de 60 genes de clase III. Una visión global de los grupos principales de genes de clases I, II y III en el CMH del ratón y del hombre se representa en la Figura A4.2.1 (Avances y descubrimientos 4.2). Otros mapas más detallados de cada región se ofrecen en las Figuras 4.21 a 4.23. Con el propósito de simplificar estos mapas génicos se omitieron varios seudogenes.

Se ha demostrado con claridad que la molécula de clase I de la superficie celular, basada en una cadena transmembrana con tres dominios extracelulares asociados a β_2-microglobulina, es una estructura muy útil a juzgar por el número de variantes sobre este tema que se han originado durante la evolución. Es conveniente subdividirlas primero en las **moléculas de clase I clásicas** (a veces denominadas como clase Ia), HLA-A, HLA-B y HLA-C en el ser humano y H-2K, H-2D y H-2L en el ratón. Fueron definidas serológicamente por anticuerpos provenientes de individuos injertados usando métodos desarrollados en los estudios precursores de Gorer (Avances y descubrimientos 4.2). Otras moléculas, a veces denominadas como de clase Ib, tienen estructuras relacionadas y son codificadas dentro del locus CMH propiamente dicho (moléculas **"no clásicas"** del CMH, como HLA-E, HLA-F y HLA-G, HFE, MICA y MICB en seres humanos, H-2T, H-2Q y H2-M murinos) o en otra parte del genoma (moléculas **"relacionadas con las cadena de clase I"**, que abarca la familia CD1 y FcRn). Los genes no clásicos del CMH son bastante menos polimorfos que el CMH clásico y a menudo invariables, y muchos son seudogenes. Muchas de estas moléculas de clase I no clásicas del CMH forman estructuras que son muy similares a las moléculas de clase I, y también se determinó que presentan antígenos no peptídicos o péptidos canónicos (es decir, invariables) que cumplen funciones en el control de los niveles globales de estrés celular. Estas moléculas no clásicas del CMH se tratarán con mayor detalle al final de este capítulo.

Los genes del CMH muestran un notable polimorfismo

A diferencia de lo que sucede con el sistema de la inmunoglobulina en el cual, como hemos visto, la variabilidad se logra en cada individuo por un sistema **multigénico**, el CMH evolucionó en lo que se refiere a la variabilidad entre los individuos con un sistema muy **polimorfo** (literalmente, "de muchas formas") basado en **múltiples alelos** (es decir, genes alternativos en cada locus). Es probable que esto se haya originado a través de la **selección dirigida por el patógeno** para formar nuevos alelos que pueden ofrecer un aumento del nivel de aptitud (*fitness*) para el individuo; en este contexto, la aptitud podría significar un aumento de la protección contra un microorganismo infeccioso. Los genes de clase I y de clase II son los más polimorfos del genoma humano; en algunos de éstos se han identificado más de 600 variantes alélicas (Figura 4.24). Ello implica que ha habido una intensa presión selectiva en la región CMH del gen y que los genes dentro de esta región mutan a una velocidad mucho más rápida que en otros locus génicos.

Como se ilustra en la Figura 4.24, las moléculas de clase I HLA-A, HLA-B y HLA-C son sumamente polimorfas, lo mismo que las cadenas β de la clase II (en orden decreciente de HLA-DRβ a HLA-DPβ y luego a HLA-DQβ), y si bien en menor grado que las cadenas β, las cadenas α de HLA-DP y HLA-DQ. HLA-DRα y β_2-microglobulina son invariables en lo que respecta a la estructura. Los cambios de aminoácidos que determinan este polimorfismo están restringidos a los dominios α_1 y α_2 de la clase I y a los dominios α_1 y β_1 de clase II. Es de enorme importancia que se produzcan sobre todo en el piso de la hoja plegada β y en las superficies internas de las α hélices que cubren la cavidad central (Figura 4.17a) y también en las superficies superiores de las hélices; éstas son las mismas superficies que establecen contacto con los péptidos que esas moléculas de CMH ofrecen para la inspección por los TCR (Figura 4.18). La ubicación no aleatoria en la que los alelos del CMH difieren entre sí es el resultado de la selección positiva sobre el curso de la evolución animal debido a las interacciones huésped-patógeno. Como consecuencia de la naturaleza polimorfa de las moléculas del CMH, el espectro de péptidos unidos por estas moléculas es muy variable. En el Capítulo 5 analizaremos con mayor detalle cómo el péptido interactúa con las moléculas del CMH del piso de la hoja plegada β debido a que estas interacciones influyen de modo considerable en el tipo de péptidos que puede ser presentado por moléculas particulares. El dinamismo continuo que crea moléculas nuevas de CMH, con las hendiduras de unión al péptido ligeramente alteradas, es semejante a una carrera de armamentos genéticos donde el sistema inmunitario intenta siempre mantenerse un paso por delante del enemigo. Este arte genético de colocarse siempre en una situación de superioridad se ha denominado **selección de equilibrio dirigida por patógenos** porque los heterocigotos tienen una ventaja selectiva típica sobre los homocigotos en un locus dado.

La región del CMH representa un punto "caliente" importante con tasas de mutación superiores en dos órdenes de magnitud a las de los locus que no pertenecen a la región del CMH. Estas formas alélicas múltiples pueden generarse por una diversidad de mecanismos: mutaciones puntuales, recombinación, entrecruzamiento homólogo pero desigual y **conversión génica**.

El grado de homología de secuencia y la presencia aumentada del motivo dinucleótido 5'-citosina-guanina-3' (para producir las que se denominan islas CpG) parecen ser importantes para la conversión génica, y se ha sugerido que esto puede involucrar una actividad de formación de muescas del DNA dirigida a las secuencias del DNA con alto contenido en CpG. Los genes del CMH que carecen de estas secuencias, por ejemplo, H-2Ea^d y HLA- DRA, no parecen sufrir conversión génica, mientras que aquellos que tienen islas CpG actúan como donantes (p. ej., H-2Eb^b, H-2Q2^k, H-2Q10^b), como aceptores (p. ej., H-2A^b) o como ambos (p. ej., H-2K^k, HLA-DQB1). El gran número de seudogenes dentro del CMH puede representar una acumulación de reservas de información genética para la generación de diversidad polimórfica en las moléculas de clase I y de clase II "funcionantes".

Cepa	Haplotipo	Designación del CMH	I	II				III		I	
C57BL	*b*	*H-2^b^*	K^b	Ab^b	Aa^b	Eb^b	Ea^b	$C4^b$	etc	D^b	etc.
CBA	*k*	$H\text{-}2^k$	K^k	Ab^k	Aa^k	Eb^k	Ea^k	$C4^k$	etc	D^k	etc.

Figura 4.25. Cómo funciona la definición del haplotipo *H-2*.

A la cepa pura de ratones homocigotos para toda la región *H-2* por apareamiento prolongado entre hermanos al menos durante 20 generaciones se le asigna un **haplotipo** designado por un supraíndice.
Así, al conjunto particular de alelos que aparece en la cepa denominada C57BL se le asigna el haplotipo ***H-2ᵇ*** y la secuencia de nucleótidos particular de cada alelo en su CMH es denominado **gen^b**, por ejemplo, ***H-2K^b***, etc. Es sin duda más conveniente describir un alelo dado por el haplotipo que exponer su secuencia de nucleótidos entera, y es más fácil seguir las reacciones de células de *H-2* conocidas cuando se utiliza la terminología del haplotipo; véase, por ejemplo, la interpretación del experimento en la Figura 4.26.

Cepa	CBA	Híbrido F1	DBA/2
Genotipo H-2		k x d k/d	
Linfocitos (fenotipo H-2)	k k	k d	d d
Anti-H-2^k	**muerte**	**muerte**	-
Anti-H-2^d	-	**muerte**	**muerte**

Figura 4.26. Herencia y expresión codominante de genes del CMH.

Cada animal de una cepa progenitora homocigota (pura) tiene dos cromosomas idénticos que poseen un haplotipo *H-2*, uno paterno y otro materno. Así, en el ejemplo presente designamos una cepa que es *H-2^k* como *k/k*. La primera generación familiar (F1) obtenida por cruzamiento de las cepas progenitoras puras CBA *(H-2^k)* y DBA/2 *(H-2^d)* tiene el genotipo *H-2 k/d*. Dado que el 100% de los linfocitos es destruido en presencia de complemento por anticuerpos para H-2^k o H-2^d (producidos por inoculación de linfocitos H-2^k en un animal H-2^d, y a la inversa), las moléculas del CMH codificadas por ambos genes progenitores deben estar expresadas en cada linfocito. Lo mismo es válido para otros tejidos del organismo.

Nomenclatura

Dado que gran parte del trabajo experimental relacionado con el CMH se basa en experimentos realizados en nuestro pequeño amigo del laboratorio, el ratón, puede ser útil explicar la nomenclatura utilizada para describir los genes alélicos y sus productos. Si alguien le dice en una lengua poco conocida "estamos teniendo elecciones libres", usted no comprende, no porque la idea sea complicada, sino porque ignora el idioma. Es similar a lo que sucede con las abreviaturas utilizadas para describir el sistema H-2, que asusta de manera innecesaria al no iniciado en el problema. Con el objeto de identificar y comparar los genes alélicos dentro del complejo H-2 en diferentes cepas, es habitual comenzar con ciertas cepas puras endocriadas homocigotas, obtenidas por apareamientos sucesivos entre hermanos, para proporcionar los prototipos. El conjunto de genes del complejo H-2 se denomina **haplotipo**, y al haplotipo de cada cepa endocriada prototípica se le asigna un superíndice dado. Por ejemplo, el haplotipo de la cepa DBA se designa *H-2^d* y los genes que constituyen el complejo son por consiguiente *H-2K^d*, *H-2Aa^d*, *H-2Ab^d*, *H-2D^d*, y así sucesivamente; sus productos serán H-2K^d, H-2A^d, H-2D^d, etc. (Figura 4.25). Cuando se producen nuevas cepas a partir de éstas por recombinación genética durante el cruzamiento, se les asignan nuevos haplotipos, pero los genes individuales se designan por el haplotipo de la cepa prototipo de la que derivaron. Así, la cepa A/J producida por entrecruzamiento genético entre ratones F1 (*H-2^k* × *H-2^d*) (Figura 4.26) se asigna de manera arbitraria al haplotipo *H-2^a*, pero el Cuadro 4.4 muestra que los genes individuales en el complejo se identifican por el símbolo del haplotipo de los progenitores originales.

Herencia del CMH

Los ratones de cepas puras provenientes de apareamientos prolongados entre hermanos son homocigotos para cada par de cromosomas homólogos. Así, en el contexto presente, el haplotipo del CMH derivado de la madre será idéntico al del padre; los animales de la cepa C57BL, por ejemplo, tendrán dos cromosomas con el haplotipo *H-2^b* (véase Cuadro 4.4).

Cuadro 4.4. Haplotipos del complejo *H-2* de algunas de las cepas de ratones utilizadas con mayor frecuencia y recombinantes derivados de ellas. A/J derivó por entrecruzamiento (k x d) de ratones F1, la recombinación se produjo entre regiones E (clase II) y S (clase III)*.

		ORIGEN DE REGIONES INDIVIDUALES				
CEPA	HAPLOTIPO	K	A	E	S	D
C57BL	*b*	*b*	*b*	*b*	*b*	*b*
CBA	*k*	*k*	*k*	*k*	*k*	*k*
DBA/2	*d*	*d*	*d*	*d*	*d*	*d*
A/J	*a*	*k*	*k*	*k**	*d*	*d*
B.10A(4R)	*h4*	*k*	*k*	*b*	*b*	*b*

Analicemos cómo se comporta el CMH cuando cruzamos dos cepas puras de haplotipos $H\text{-}2^k$ y $H\text{-}2^d$, respectivamente. Encontramos que los linfocitos de la descendencia (la generación F1) en su totalidad presentan *ambas* moléculas H-2^k y H-2^d en su superficie, es decir, existe una **expresión codominante** (Figura 4.26). Si luego cruzamos la generación F1 entre sí, la progenie presenta los genotipos *k, k/d* y *d* en las proporciones esperadas si el **haplotipo se segrega como un rasgo mendeliano único**. Esto sucede debido a que el complejo H-2 abarca 0,5 centimorgan, lo cual equivale a una frecuencia de recombinación entre los extremos *K* y *D* del 0,5%, y el haplotipo tiende a heredarse *en bloque*. Sólo las relativamente poco frecuentes recombinaciones causadas por fenómenos de entrecruzamiento meiótico, como el descrito antes para la cepa A/J, revelan la complejidad del sistema.

Distribución tisular de las moléculas del CMH

En esencia, todas las células nucleadas tienen moléculas de clase I clásicas. Son expresadas profusamente en las células linfoides y mieloides, menos en el hígado, el pulmón y el riñón, y sólo de manera escasa en el cerebro y el músculo esquelético. En los seres humanos, la superficie del citotrofoblasto extravelloso placentario carece de HLA-A y HLA-B, si bien en la actualidad hay alguna evidencia de que puede expresar HLA-C. Lo que sí está bien establecido es que este citotrofoblasto extravelloso y otros tejidos placentarios expresan HLA-G, una molécula que por lo general carece de alodeterminantes y que no se presenta en la mayoría de las otras células somáticas, salvo en la médula y el epitelio subcapsular del timo, y los monocitos de la sangre después de la activación con interferón γ. La función del HLA-G en la placenta no está del todo aclarada, pero parece actuar como remplazo para las moléculas de clase I clásicas para inhibir las respuestas inmunitarias contra los alelos del CMH paternos que tiene el feto. Por otro lado, las moléculas de clase II están muy restringidas en su expresión y aparecen sólo en las células B, las células dendríticas, los macrófagos y el epitelio del timo. Sin embargo, cuando las células del endotelio capilar y muchas células epiteliales en tejidos distintos del timo son activadas por agentes como el interferón γ expresan moléculas de clase II en su superficie y niveles más altos de clase I.

Moléculas no clásicas y moléculas relacionadas con la cadena de clase I del CMH

Estas moléculas incluyen la familia **CD1** que utiliza β_2-microglobulina y tiene una estructura global similar a las moléculas de clase I clásicas (Figura 4.27). Sin embargo, están codificadas por un conjunto de genes situados en un cromosoma diferente del CMH, es decir, en el cromosoma 1 en los seres humanos y en el cromosoma 3 en los ratones. Como verdadero equivalente del CMH, el CD1 participa en la presentación de antígenos a las células T, pero la hendidura de unión al antígeno está en alguna extensión recubierta, contiene sobre todo aminoácidos hidrófobos y sólo es accesible a través de una entrada estrecha. En lugar de los péptidos de unión a los antígenos, las moléculas CD1 por lo general presentan lípidos o glucolípidos. Al menos se encuentran cuatro moléculas diferentes de CD1 expresadas en las células humanas: CD1a, b y c están presentes en los timocitos corticales, las células dendríticas y una subpoblación de células de B, mientras que CD1d se expresa en el epitelio intestinal, los hepatocitos y todas las células linfoides y mieloides. Los ratones sólo parecen expresar dos moléculas diferentes de CD1, ambas similares, en lo que se refiere a la estructura y la distribución en los tejidos, al CD1d humano y a las que se denomina CD1d1 y CD1d2 (o CD1.1 y CD1.2).

En el CMH propiamente dicho, los genes que codifican las moléculas no clásicas del CMH incluyen los locus H-2T, H-2Q y H-2M en ratones, cada uno de los cuales codifica varias moléculas diferentes. Por ejemplo, las moléculas T22 y T10 son inducidas por la activación celular y reconocidas directamente por el TCR γδ sin un requerimiento para el antígeno, lo cual tal vez sugiere que intervienen en la estimulación inmunorreguladora de las células T γδ. Otras moléculas de clase I no clásicas se unen a péptidos; por ejemplo, H-2M3 presenta péptidos *N*-formilados producidos en las mitocondrias o por las bacterias.

En los seres humanos, la molécula **HLA-E** se une a un péptido de nueve aminoácidos proveniente de la secuencia señal de las moléculas HLA-A, HLA-B, HLA-C y HLA-G, y es reconocido por los receptores CD94/NKG2 localizados en las células NK y las células T citotóxicas, así como por el TCR αβ en algunas células T citotóxicas. HLA-E está sobreexpresada cuando otros alelos HLA proporcionan los péptidos líderes apropiados, lo cual quizá permite a las células NK supervisar la expresión de moléculas de clase I polimorfas que utilizan un único receptor. El homólogo murino, Qa-1, desempeña una función similar.

Las moléculas MICA y MICB inducibles por el estrés (moléculas relacionadas con la cadena de clase I del CMH) tienen la misma estructura del dominio que la molécula de clase I clásica y presenta un nivel de polimorfismo relativamente alto. Están presentes en las células epiteliales, sobre todo en el tracto gastrointestinal y en la corteza del timo, y son reconocidos por la molécula activadora NKG2D. Una posible función de esta interacción se da en el desarrollo de respuestas antitumorales de las células NK y T.

La función de **HLA-F** no es clara, aunque su expresión en el trofoblasto placentario ha llevado a pensar que puede des-

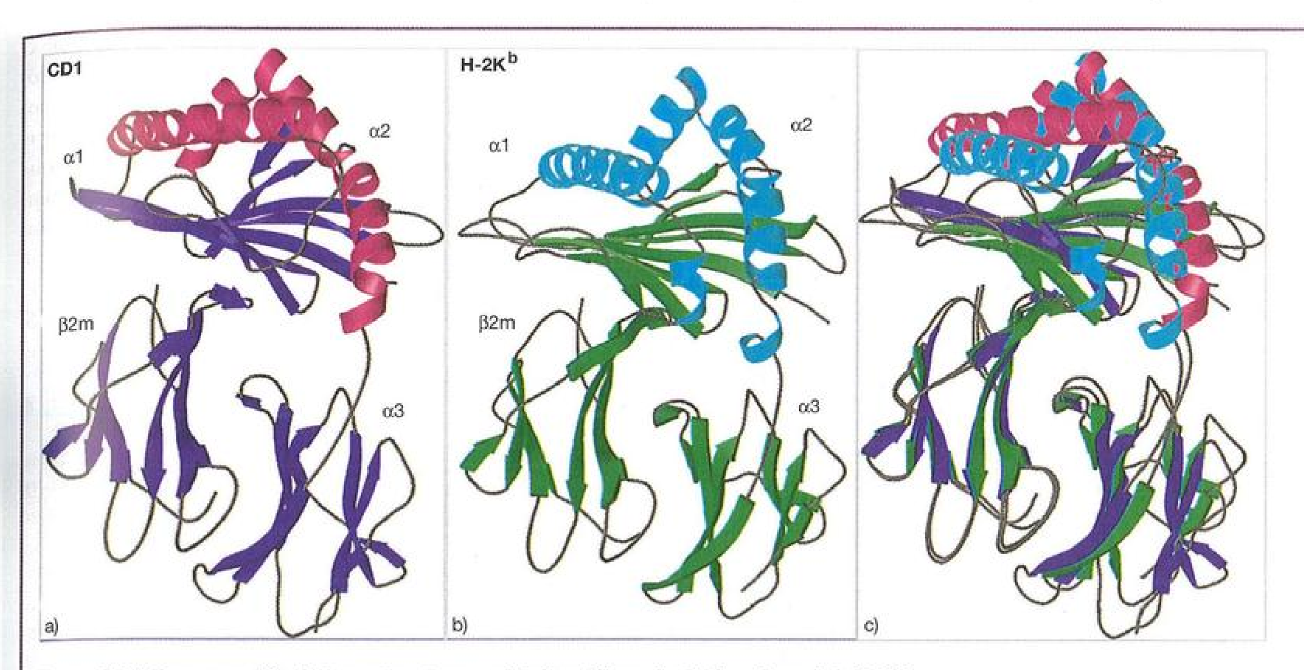


Figura 4.27. Comparación de las estructuras cristalográficas de CD1 y clase 1 del CMH.

a) Diagrama de cinta del CD1d1 del ratón (rojo, hélices α; azul, hebras β). b) diagrama de cintas de la molécula clase I del CMH del ratón H-2K^b (celeste, hélices α; verde, hebras β). c) La superposición que utiliza alineación de β_2-microglobulina resalta algunas de las diferencias entre CD1d1 y H-2K^b. Obsérvese en particular el cambio de las hélices α. Esto produce una hendidura más profunda y voluminosa en CD1d1, que es más estrecha en su entrada que H-2K^b. (Reproducido con autorización de Porcelli S.A. y cols. [1998] *Immunology Today* **19**, 362).

empeñar una función en la protección del feto en desarrollo del ataque por el sistema inmunitario. En este contexto se encontró una función más definitiva para **HLA-G**. Esta molécula HLA también se expresa de modo preferencial en las células del trofoblasto placentario, donde participa en la protección del feto de los efectos no deseados de las células NK, y las células citotóxicas maternas. Durante mucho tiempo ha sido un acertijo explicar por qué las madres toleran a sus fetos genéticamente no idénticos debido a que por lo general se esperaría una intensa respuesta inmunitaria contra moléculas extrañas del HLA (es decir, provenientes del padre). Mientras que esto se resuelve parcialmente a través de la regulación por disminución de la expresión de las moléculas de clases I A, B y C del CMH en la placenta, esto normalmente atraería las atenciones de las células NK en su merodeo para la búsqueda de células con estas características de pérdida de lo propio, como comentamos antes en referencia a los receptores NK. La expresión de HLA-G en la interfaz del trofoblasto placentario materno parece ser una solución. La interacción entre la molécula del transcrito 2 similar a la inmunoglobulina (ILT2) de las células NK, que es un receptor NK inhibidor, con el HLA-G expresado en el trofoblasto placentario confiere protección contra la citólisis mediada por células NK.

HFE, antes conocido como HLA-H, tiene una hendidura sumamente estrecha que es incapaz de unirse a los péptidos, y tal vez no desempeñe ninguna función en la defensa inmunitaria. Sin embargo, se une al receptor de transferrina y parece estar involucrado en la captación de hierro. Una mutación puntual (C282Y) en el HFE se encuentra en el 70-90% de los pacientes con hemocromatosis hereditaria.

Las moléculas no clásicas del CMH pueden ser los precursores de las moléculas clásicas del CMH

El análisis de los genomas de los vertebrados sugiere que moléculas invariables no clásicas del CMH sean tal vez el precursor primordial de las modernas moléculas polimorfas de clase I y de clase II del CMH y, en lugar de participar en la presentación del antígeno, estas moléculas se usaron con mayor probabilidad como "señales de peligro" primitivo que participaron en la transmisión de señales de estrés a las células inmunitarias innatas. Por lo tanto, la expresión de estas moléculas en la superficie celular significó la presencia de una célula que sufre estrés o se halla potencialmente transformada que debería ser eliminada por el interés de la aptitud general del cuerpo. Durante el curso de la evolución es muy probable que esas moléculas desarrollaran la capacidad de unirse a los péptidos propios, que al principio eran relativamente invariables, seguido por la capacidad de unirse a péptidos muy variables como vemos ahora con los productos génicos de clase I y de clase II clásicos del CMH. La aparición de moléculas polimorfas del CMH, como consecuencia de acontecimientos de duplicación génica seguidos de divergencia, habría permitido una diversidad mucho mayor en la variedad de péptidos unidos por estas moléculas. Así, las moléculas invariables similares al CMH (p. ej., HLA-E; HLA-F, HLA-G y MICA, MICB) no suelen tener funciones en la presentación del antígeno, pero cumplen funciones homeostáticas o reguladoras que permiten que las células del sistema inmunitario innato supervisen la salud celular de una manera bastante inespecífica para el antígeno.

Un buen ejemplo, que se analizó en el contexto de los receptores de NK, pero que vale comentarlo de nuevo, es la molécula HLA-E que une un péptido de nueve aminoácidos derivado de las moléculas HLA-A, HLA-B y HLA-C de la secuencia señal. La ausencia de complejos HLA-E-péptido de las células sugiere que puede estar presente un agente infeccioso o que las células están sufriendo, de alguna manera, una situación de estrés. Esto produce la activación de células NK a través de los receptores activadores CD94/NKG2, con la consiguiente muerte mediada por NK de estas células. Ante la ausencia de péptidos guía de clase I, HLA-E puede ser estabilizado en la superficie de las células que sufren estrés por tratamiento con choque térmico porque el péptido señal HSP-60 también puede unirse en lugar de los péptidos de clase I del HLA. Sin embargo, estos complejos de péptido líder HLA-E/HSP-60 no son reconocidos por el receptor CD94/NKG2 que, una vez más, precipita el ataque por la célula NK. Así, el estrés celular puede anular la presentación de péptidos derivados de la clase I a través de la competición por péptidos derivados de HSP-60 que podrían no estar presentes en niveles lo suficientemente altos como para competir en forma eficaz en células que no sufren estrés. Si esto no es un sistema de seguridad molecular inteligente, no sabemos lo que es.

RESUMEN

Receptor de superficie de la célula B para el antígeno

- La célula B inserta en la superficie su producto génico Ig que contiene un segmento transmembrana, el cual actúa como un receptor específico para el antígeno.
- El antígeno específico induce la formación de microagregados del receptor de célula B (BCR) formados por 50-500 receptores que parecen representar la forma activa del BCR.
- La Ig de superficie forma un complejo con las proteínas de membrana Ig-α e Ig-β que son fosforiladas con la activación celular y transducen señales recibidas a través del receptor Ig para el antígeno.
- Las colas citoplasmáticas de los motivos de activación basados en tirosina (ITAM) del inmunorreceptor Ig-α e Ig-β que tras la fosforilación pueden reclutar las proteínas de unión a la fosfotirosina, cumplen funciones importantes en la transducción de la señal del BCR.
- El correceptor de la célula B actúa en sinergia con el BCR para activar productivamente las células B.

Receptor de superficie de la célula T para el antígeno

- El receptor para el antígeno es un dímero transmembrana en el que cada cadena está formada por dos dominios del tipo Ig.
- Los dominios externos presentan una estructura variable y los internos son constantes, bastante similar a un Fab unido a la membrana.
- Se requieren ambas cadenas para el reconocimiento del antígeno.
- La mayoría de los TCR sólo puede reconocer el antígeno cuando son presentados en el contexto de las moléculas del CMH.
- CD4 y CD8 actúan como correceptores, junto con TCR, para las moléculas del CMH. CD4 funciona como un correceptor para las moléculas de clase II del CMH y CD8 reconoce moléculas de clase I del CMH.
- La mayoría de las células T expresa un receptor (TCR) con cadenas α y β (TCR2). Un linaje separado (TCR1) que tiene receptores γδ es transcrito fuertemente en la ontogenia tímica, pero se asocia sobre todo con los tejidos epiteliales en el adulto.
- La codificación del TCR es similar a la de las inmunoglobulinas. La región variable que codifica la secuencia en la diferenciación de células T está formada por la translocación al azar de grupos de los segmentos *V*, *D* (para las cadenas β y δ) y *J* que da una secuencia recombinante única *V(D)J* para cada cadena.
- A semejanza de lo que sucede con las cadenas de Ig, cada región variable tiene tres secuencias hipervariables que intervienen en el reconocimiento del antígeno.
- El complejo CD3, compuesto por cadenas γ, δ, ε y dímeros ξ, ξη o η unidos covalentemente, forma una parte íntima del receptor y desempeña una función en la transducción de la señal después de la unión del ligando al TCR.

Generación de diversidad del anticuerpo para el reconocimiento del antígeno

- Las cadenas ligera y pesada de la Ig y las cadenas αy β del TCR suelen estar representadas en la línea germinal por 33 a 75 genes de la región variable, 2 a 27 minigenes del segmento *D* (Ig pesada y TCR β y δ sólo) y 3 a 60 segmentos *J* cortos.
- Las cadenas γ y δ del TCR son codificadas por una cantidad mucho menor de genes.
- La recombinación al azar de cualquier gen individual *V*, *D* y *J* proveniente de cada grupo génico da origen a unas $6,5 \times 10^3$ secuencias *VDJ* de cadena pesada de Ig, 350 cadenas ligeras, $4,5 \times 10^3$ TCR α, 1×10^3 TCR γδ y sólo 60 TCR γ y 72 TCR δ.
- La combinación intercatenaria al azar produce cerca de $2,4 \times 10^6$ receptores de Ig, $4,5 \times 10^6$ receptores TCR αβ y $4,3 \times 10^3$ receptores TCR γδ.
- Se introduce una diversidad adicional en las uniones entre los segmentos *V*, *D* y *J* por combinación variable a medida que sufren el proceso de corte y empalme por enzimas recombinasas y por la inserción al azar en la región N de secuencias de nucleótidos codificantes. Estos mecanismos adquieren particular importancia en el aumento de especificidades que pueden extraerse de la dotación relativamente pequeña de γδ
- Los receptores inútiles o autorreactivos pueden ser sustituidos mediante la corrección *(editing)* del receptor.
- Además, después de una respuesta primaria, las células B, pero no las células T, sufren una tasa alta de mutación somática que afecta las regiones *V*.

Receptores NK

- Las células NK tienen varios receptores con dominios de tipo Ig y otros receptores con dominios de lectina de tipo C. Los miembros de ambas clases de familia de receptores pueden funcionar como inhibidores o activadores para determinar si la célula diana debe ser destruida.

- Los receptores NK están integrados (es decir, codificados por la línea germinal) y logran la diversidad a través de su número puro más que a través de la recombinación somática.
- La pérdida de moléculas de clase I del CMH puede provocar el ataque por las células NK.
- Las células NK también pueden reconocer ligandos, que por lo general son moléculas no clásicas similares al CMH, sobreexpresadas por células que sufren estrés o daño del DNA.

CMH

- Las moléculas del CMH actúan como receptores para el antígeno y presentan péptidos provenientes del antígeno a las células T.
- Cada especie de vertebrados tiene un CMH identificado en un inicio a través de su capacidad de evocar rechazos de trasplante muy poderosos.
- Cada una contiene tres clases de genes. La clase I codifica polipéptidos transmembrana de 44 kDa asociados en la superficie celular con β_2-microglobulina. Las moléculas de clase II son heterodímeros transmembrana. Los productos de clase III son heterogéneos, pero incluyen componentes del complemento unidos a la formación de C3 convertasas, proteínas del choque térmico y factores de necrosis tumoral.
- Las moléculas de clase I del CMH presentan péptidos endógenos sintetizados por la célula, mientras que las moléculas de clase II del CMH presentan péptidos exógenos que han sido internalizados por la célula.
- Todas las células expresan varios tipos diferentes de moléculas de clase I y de clase II del CMH. Los genes CMH también despliegan un polimorfismo notable. Un grupo génico CMH dado se denomina haplotipo y, por lo general, se hereda en bloque como un rasgo mendeliano único, aunque sus genes constitutivos fueron puestos de manifiesto en procesos de recombinación por entrecruzamiento.
- Lo más probable es que el estado muy polimorfo de las moléculas de clase I y de clase II del CMH se haya originado como consecuencia de la selección dirigida por el patógeno y maximiza el número de péptidos derivados del patógeno que pueda ser presentado al sistema inmunitario.
- Las moléculas de clase I clásicas se hallan en casi todas las células del cuerpo y presentan péptidos a las células T citotóxicas $CD8^+$.
- Las moléculas de clase II están particularmente asociadas con las células B, las células dendríticas y los macrófagos, pero pueden ser inducidas por el interferón γ en las células endoteliales de los capilares y en las células epiteliales. Estas moléculas presentan péptidos a las células T *helper* $CD4^+$ para las células B y los macrófagos.
- Los dos dominios distales a la membrana celular forman una cavidad de unión al péptido limitada por dos hélices α paralelas que asientan en un piso de hebras de hoja plegada β; las paredes y el piso de la cavidad, y la superficie superior de las hélices, son los sitios de máximas sustituciones polimorfas de aminoácidos.
- Los genes silenciosos de clase I pueden aumentar el polimorfismo por mecanismos de conversión génica.
- Las moléculas no clásicas del CMH y las moléculas similares a CMH tienen varias funciones, e incluyen CD1, que presenta antígenos lipídicos y glucolipídicos a las células T, y HLA- E, que presenta secuencias de péptidos de señal a partir de las moléculas de clase I al receptor CD94/NKG2 de las células NK.
- Es probable que las moléculas invariables no clásicas similares al CMH representen el precursor primordial de las modernas moléculas polimorfas de clase I y de clase II del CMH.

LECTURAS ADICIONALES

Biassoni R. (2009) Human natural killer receptors, co-receptors, and their ligands. Current Protocols in Immunology. Chapter 14 Unit 14.10. John Wiley & Sons.

Braud V.M., Allan D.S.J. & McMichael A.J. (1999) Functions of nonclassical MHC and non-MHC-encoded class I molecules. Current Opinion in Immunology 11, 100–108.

Call M.E. & Wucherpfennig K.W. (2005) The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. Annual Review of Immunology 23, 101–125.

Carding S.R. & Egan P.J. (2002) γδ T cells: functional plasticity and heterogeneity. Nature Reviews Immunology 2, 336–345.

Clark D.A. (1999) Human leukocyte antigen-G: new roles for old? American Journal of Reproductive Immunology 41, 117–120.

Flajnik M.F. & Kasahara M. (2010) Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. Nature Reviews Genetics 11, 47–59.

Garcia K.C. & Adams E.J. (2005) How the T cell receptor sees antigen—a structural view. Cell 122, 333–336.

Gleimer M. & Parham P. (2003) Stress management: MHC class I and class II molecules as receptors of cellular stress. Immunity 19, 469–477.

Godfrey D.I., Rossjohn J. & McCluskey J. (2008) The fidelity, occasional promiscuity, and versatility of T cell receptor recognition. Immunity 28, 304–314.

Grawunder U. & Harfst E. (2001) How to make ends meet in V(D)J recombination. Current Opinion in Immunology 13, 186–194.

Horton R. et al. (2004) Gene map of the extended human MHC. Nature Reviews Genetics 5, 889–899.

Hunt JS. (2006) Stranger in a strange land. (Review on HLA-G and pregnancy) Immunological Reviews 213, 36–47.

Kelsoe G. (1999) V(D)J hypermutation and receptor revision: coloring outside the lines. Current Opinion in Immunology 11, 70–75.

Krangel M.S. (2009) Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. Current Opinion in Immunology 21, 133–139.

Kumanovics A. et al. (2003) Genomic organization of the mammalian MHC. Annual Review of Immunology 21, 629–657.

Kumar V. & McNerney M.E. (2005) A new self: MHC class I-independent natural-killer cell self-tolerance. Nature Reviews Immunology 5, 363–374.

Longerich S., Basu U., Alt F. & Storb U. (2006) AID in somatic hypermutation and class switch recombination. Current Opinion in Immunology 18, 164–174

Mak T.W. (1998) T-cell receptor, α, β In: Delves P.J. & Roitt I.M. (eds.) Encyclopedia of Immunology, 2nd edn, pp. 2264–2268. Academic Press, London. (See also article by Hayday A. & Pao W. on the γδ TCR; ibid., pp. 2268–2278.)
Matsuda F. et al. (1998) The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. Journal of Experimental Medicine 188, 2151–2162.
Matthews A.G. & Oettinger M.A. (2009) RAG: a recombinase diversified. Nature Immunology 10, 817–821.
MHC Sequencing Consortium (1999) Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. Nature 401, 921–923.
Moody D.B., Zajonc D.M. & Wilson I.A. (2005) Anatomy of CD1–lipid antigen complexes. Nature Reviews Immunology 5, 387–399.
Nemazee D. (2000) Receptor editing in B cells. Advances in Immunology 74, 89–126.
Parham P. (2008) The genetic and evolutionary balances in human NK cell receptor diversity. Seminars in Immunology 20, 311–316.
Prugnolle F. et al. (2005) Pathogen-driven selection and worldwide HLA class I diversity. Current Biology 15, 1022–1027.
Raulet D.H. (2004) Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. Nature Immunology 5, 996–1002.
Salio M., Silk J.D. & Cerundolo V. (2010) Recent advances in processing and presentation of CD1 bound lipid antigens. Current Opinion in Immunology 22, 81–88.
Sasaki Y. & Kurosaki T. (2010) Immobile BCRs: the safety on the signal trigger. Immunity 32, 143–144.
de Wildt R.M.T. et al. (1999) Somatic insertions and deletions shape the human antibody repertoire. Journal of Molecular Biology 294, 701–710.



CAPÍTULO 5

Interacción primaria con el antígeno

Conceptos clave

A modo de resumen...

Las respuestas inmunitarias adquiridas montadas por los linfocitos dependen del reconocimiento específico del antígeno por el receptor de células B (BCR, una versión transmembrana de la molécula de anticuerpo) o el receptor de células T (TCR). Tras la selección clonal, los linfocitos específicos para el antígeno sufren una proliferación para producir cantidades suficientes de células efectoras y también para generar células de memoria. En el caso de las células B, las células efectoras son los plasmocitos que segregan una versión

Roitt's Essential Immunology, Twelfth Edition. Peter J. Delves, Seamus J. Martin, Dennis R. Burton, Ivan M. Roitt.

A modo de resumen... *(continución)*

soluble del mismo anticuerpo que fue utilizado como BCR en la célula B original. En el caso de las células T, las células efectoras son las células T *helper* secretoras de citocinas o las células reguladoras o las citotóxicas que destruyen otras células.

Introducción

En la inmunidad adquirida, los antígenos son reconocidos por dos clases de moléculas: 1) los anticuerpos, presentes como proteínas solubles o bien como moléculas transmembrana sobre la superficie de las células B, 2) los receptores de células T presentes como moléculas transmembrana sobre la superficie de estas células. Los anticuerpos reconocen los antígenos que se hallan en la superficie de los patógenos o en forma de material extraño soluble, como las toxinas. Los receptores de la célula T αβ reconocen péptidos en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) sobre la superficie de las células del huésped. Por lo tanto, puede considerarse que los anticuerpos examinan directamente el material extraño, mientras que las células T pesquisan las células infectadas por patógenos.

Qué reconocen los anticuerpos

Los anticuerpos reconocen las formas moleculares (epítopos) de los antígenos. Por lo general, cuanto mejor es la correspondencia del epítopo (en lo que se refiere a la conformación y a las características químicas) con el sitio de combinación del anticuerpo, más favorables son las interacciones anticuerpo-antígeno y más elevada la afinidad del uno por el otro. La afinidad del anticuerpo con el antígeno es uno de los factores más importantes para determinar cuán eficaz es el anticuerpo *in vivo*.

Los epítopos tienen una gran variedad de formas diferentes, como también la tienen los sitios de combinación de los anticuerpos. Típicamente, las superficies proteicas son reconocidas por una superficie complementaria presente en el sitio de combinación del anticuerpo, como se ilustra en la Figura 5.1, que muestra el modo en que un anticuerpo reconoce un epítopo en el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano, HER-2. Se aprecia rápidamente la magnitud de la complementariedad de las superficies que interactúan.

El área del antígeno que se pone en contacto con el anticuerpo se denomina huella y tiene por lo común entre 4 y 10 nm². Las huellas son de tamaños algo diferentes e irregulares, pero puede obtenerse una evaluación aproximada si se proyecta un cuadrado de 2,5 nm × 2,5 nm sobre la proteína (Figura 5.2).

Los anticuerpos reconocen una superficie topográfica de un antígeno proteico. Lo más común es que los residuos importantes en el epítopo se originen a partir de posiciones muy distintas en la secuencia lineal de aminoácidos de la proteína (Figura 5.3). Esto sucede por la manera en la cual se pliegan las proteínas; la secuencia lineal típicamente serpentea de un lado al otro de la proteína varias veces. Estos epítopos se describen como **discontinuos**. En ocasiones, los residuos fundamentales se originan a partir de una secuencia lineal de aminoácidos y entonces el anticuerpo puede unirse con afinidad relativamente alta a un péptido que incorpora la secuencia lineal adecuada del antígeno. Además, el péptido puede inhibir la unión del antígeno con

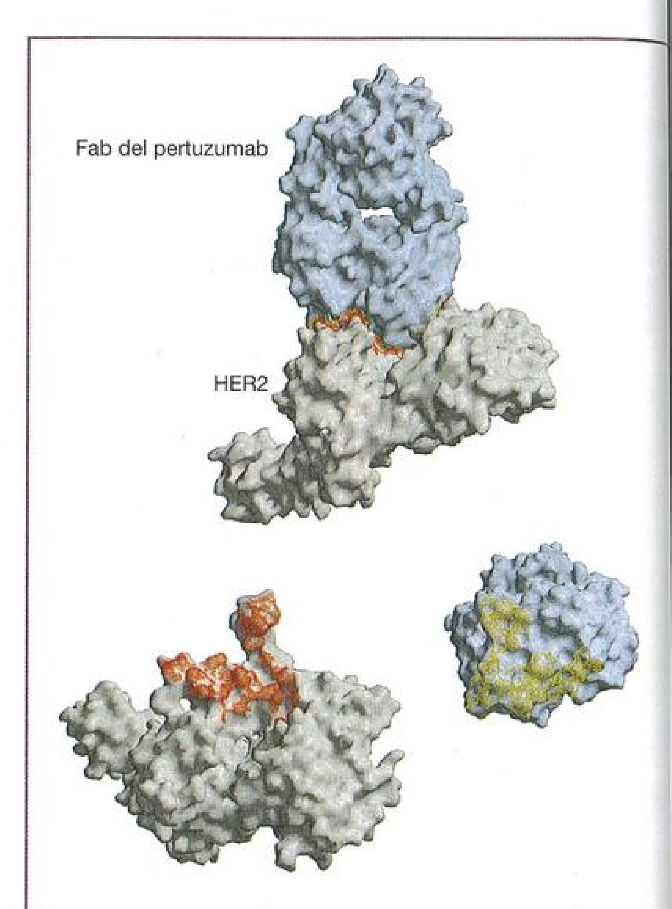


Figura 5.1. Complementariedad del sitio de combinación del anticuerpo y el epítopo reconocido sobre el antígeno. Se muestra la estructura del complejo Fab del anticuerpo pertuzumab y su antígeno HER2. HER2, el receptor para el factor de crecimiento epidérmico humano, está sobreexpresado en algunas células del cáncer de mama, y el pertuzumab es un anticuerpo similar a trastuzumab (Herceptin®), con posible efecto terapéutico contra el cáncer de mama. En la parte inferior de la figura, aparecen las dos moléculas separadas, en cada una de las cuales se observa la huella de interacción. (Cortesía de Robyn Stanfield.)

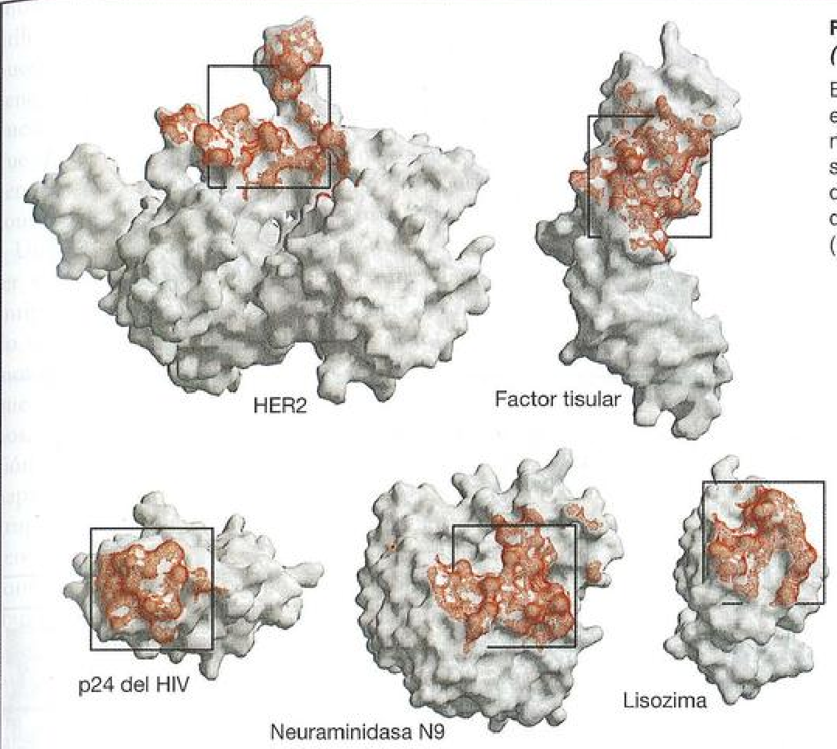


Figura 5.2. Huellas en el anticuerpo *(rojo)* para diversos antígenos.

Estas huellas se determinaron a partir de estructuras cristalográficas de los antígenos con el anticuerpo unido. Las huellas son irregulares, pero pueden representarse de manera muy aproximada como un cuadrado de 2,5 × 2,5 nm, como se muestra. (Cortesía de Robyn Stanfield.)

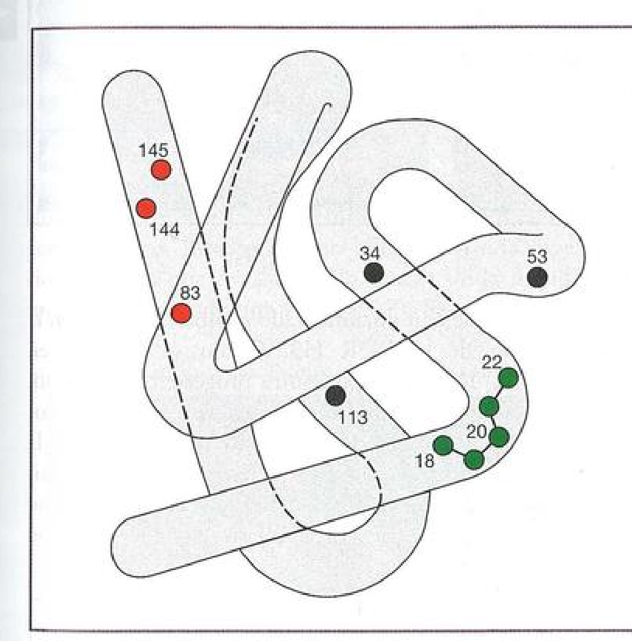


Figura 5.3. Residuos que contribuyen a los epítopos sobre la cadena peptídica plegada de mioglobina.

Los residuos de aminoácidos 34, 53 y 113 *(negro)* contribuyen a la unión de un anticuerpo monoclonal (mAc), y los residuos 83, 144 y 145 a la unión de otro mAc *(rojo)*. Claramente, estos son epítopos discontinuos. Por el contrario, un tercer mAc se une a los residuos 18-22 *(verde)*. El mAc se une a péptidos aislados que contienen la secuencia que corresponde a los residuos 18-22. El epítopo se describe como continuo. Gran parte de la estructura de la mioglobina está en la forma a-helicoidal. (Basado en Benjamín D.C. y col. [1986], *Annual Review of Immunology* **2**, 67.)

el anticuerpo. En estos casos, el epítopo se describe como **continuo**. Un ejemplo de tal tipo de epítopo sería un rulo o bucle en la superficie de la proteína para la cual el anticuerpo reconoció residuos sucesivos en el rulo. Sin embargo, debe advertirse que un anticuerpo que reconoce un epítopo continuo no se une a una estructura al azar o desordenada, sino que reconoce una estructura definida que se encuentra en la proteína completa pero puede ser adoptado con facilidad por el péptido más corto. En la Figura 5.4 se ilustra la estructura de un anticuerpo que reconoce un epítopo lineal en un complejo con un péptido que contiene el epítopo; en este ejemplo, se aprecia que la estructura del péptido es principalmente helicoidal.

Regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo que establecen contacto con el epítopo

El sitio de combinación de los anticuerpos puede presentar gran variedad de formas y peculiaridades que dependen de la longitud y las características de las CDR. Por lo general, la mayoría o todas las CDR contribuyen a la unión con

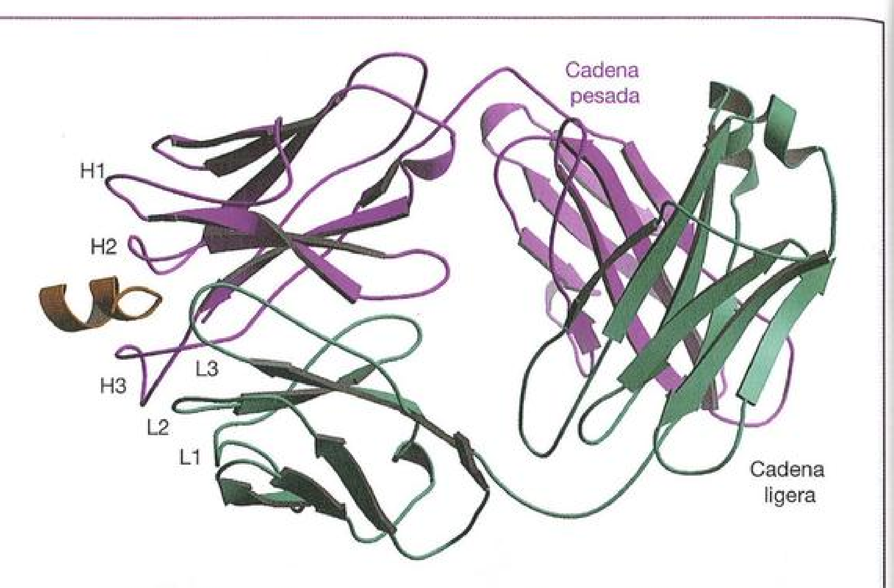
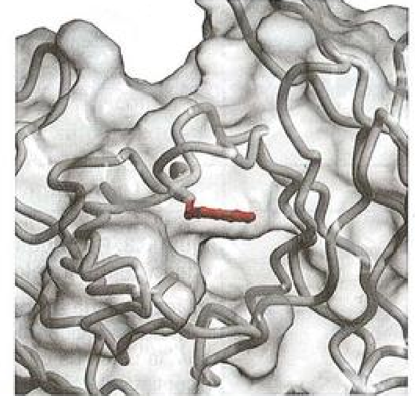


Figura 5.4. Estructura de un anticuerpo unido a un péptido correspondiente a un epítopo lineal.

El anticuerpo 4E10 neutraliza al HIV por la unión a un epítopo lineal sobre la glucoproteína gp4l situada en la superficie del virus. El anticuerpo se une a los péptidos que contienen la secuencia de aminoácidos NWFDIT, y los péptidos que contienen esta secuencia pueden inhibir la unión de 4E10 a la gp4l. La estructura del fragmento Fab de 4E10 unido a un péptido *(ocre)* que contiene la secuencia de NWFDIT muestra que éste adopta una conformación helicoidal. Es probable que el anticuerpo reconozca su epítopo en una conformación helicoidal sobre el virus. (Cortesía de Rosa Cardoso.)



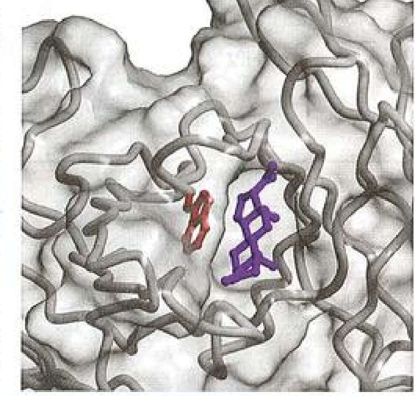


Figura 5.5. Cambio conformacional en un sitio de combinación con el anticuerpo.

a) Un anticuerpo antiprogesterona presenta un bolsillo muy hidrófobo que contiene un residuo del triptófano *(rojo)* en el anticuerpo libre. b) Para unirse a la progesterona *(azul oscuro)*, el residuo de triptófano gira fuera del bolsillo y el antígeno logra ingresar. (Cortesía de Robyn Stanfield.)

el antígeno, pero en una proporción relativa variable. La cadena pesada de las CDR, y en particular CDR H3, tiende a cooperar de manera desproporcionada con la unión con el antígeno. La CDR H3 en los anticuerpos humanos puede ser bastante larga y adquirir un aspecto digitiforme que podría ser usado para la unión en las cavidades presentes sobre el antígeno. El sitio de combinación de los anticuerpos con moléculas más pequeñas como hidratos de carbono y grupos orgánicos (haptenos) corresponde más a menudo a hendiduras o bolsillos en lugar de a superficies extensas como las que típicamente se encuentran en los anticuerpos dirigidos contra proteínas.

En la interacción de anticuerpos o de antígenos, pueden producirse cambios estructurales y reordenamientos conformacionales. En otros términos, en algunas ocasiones la relación entre el anticuerpo y el antígeno será del tipo "llave y cerradura", pero en otras la llave o la cerradura (o ambas) pueden deformarse para lograr un buen ajuste. En el caso de los anticuerpos, los posibles cambios conformacionales comprenden reordenamientos de la cadena lateral, movimientos segmentarios de las CDR o del esqueleto de la cadena principal y rotación del dominio V_L–V_H en la unión con el antígeno. En las estructuras cristalográficas de los complejos Fab, se han documentado cambios grandes en la conformación de la CDR H3. Como se muestra en la Figura 5.5, un anticuerpo contra progesterona tiene un bolsillo de combinación hidrófobo que en general está ocupado por una molécula de triptófano proveniente de la CDR H3. La unión con el antígeno determina que este residuo se mueva fuera de ese bolsillo, la molécula del antígeno se desplace hacia adentro y el triptófano estabilice la unión con el antígeno.

A medida que se esclarecieron cada vez más estructuras, se hizo evidente que las interacciones anticuerpo-antígeno asumen todas las formas y los tamaños con pocas reglas generales. Es importante tener presente que en cada individuo se forman anticuerpos de alta afinidad tras ciclos de mutación y selección. Hay múltiples maneras por las cuales puede lograrse el reconocimiento de alta afinidad de un antígeno y, en realidad, no hay dos interacciones anticuerpo-antígeno exactamente iguales.

Antígenos *vs.* inmunógenos

Un epítopo sobre un antígeno puede unirse de manera muy firme con un anticuerpo dado, pero puede inducir esos

anticuerpos de manera infrecuente cuando el antígeno se utiliza para inmunizar a un animal. En otros términos, puede haber un sitio perfectamente correcto sobre el patógeno para la unión con el anticuerpo y no obstante la respuesta de anticuerpos contra ese sitio puede ser tan escasa que sea incapaz de contribuir a la protección contra el patógeno. Se dice que el sitio tiene baja inmunogenicidad, y las consecuencias pueden ser verdaderamente importantes.

Un ejemplo extremo de la distinción entre la capacidad de ser reconocido por un anticuerpo (que denominaremos antigenicidad) y la capacidad de inducir anticuerpos cuando se utiliza para inmunizar un animal (que denominaremos inmunogenicidad) es proporcionado por experimentos que emplean moléculas pequeñas conocidas como haptenos, como el sulfonato de *m*-aminobenceno. La inmunización con el hapteno libre no origina anticuerpos contra el hapteno (Figura 5.6). Sin embargo, la inmunización con grupos haptenos unidos a una proteína transportadora genera anticuerpos que reaccionan con afinidad elevada contra el hapteno solo o unido a una molécula distinta de la transportadora. Es razonable referirse al hapteno como antígeno y al complejo hapteno-proteína como inmunógeno, aunque estrictamente la palabra "antígeno" proviene de la sustancia que genera anticuerpos (en inglés, "*anti*body *gene*-rating").

Identificación por la célula B de los epítopos presentes sobre una proteína

¿Cuántos epítopos hay sobre una única proteína? Esto depende del modo en que se define un epítopo. Para la proteína pequeña lisozima (peso molecular ~14.300 dalton), se han determinado las estructuras de tres anticuerpos monoclonales no competitivos que forman complejos con el antígeno proteico. Éstos presentan huellas con una superposición mínima que recubren sólo menos de la mitad de la superficie de la proteína (Figura 5.7). Se podría extrapolar que una proteína pequeña como ésa tendría entre tres y seis epítopos no superpuestos reconocidos por anticuerpos que no compiten. La especificidad de un anticuerpo dado podría definirse entonces por su capacidad de competir con los tres a seis anticuerpos "prototipo". En la práctica, esto sucede con frecuencia; se dice que un anticuerpo está dirigido contra un epítopo dado si compite con un anticuerpo prototipo de especificidad conocida. Se trata, de hecho, de una visión bastante simplista ya que muchos anticuerpos compiten con más de un anticuerpo prototipo, lo que permite la construcción de un mapa del epítopo más intrinca-

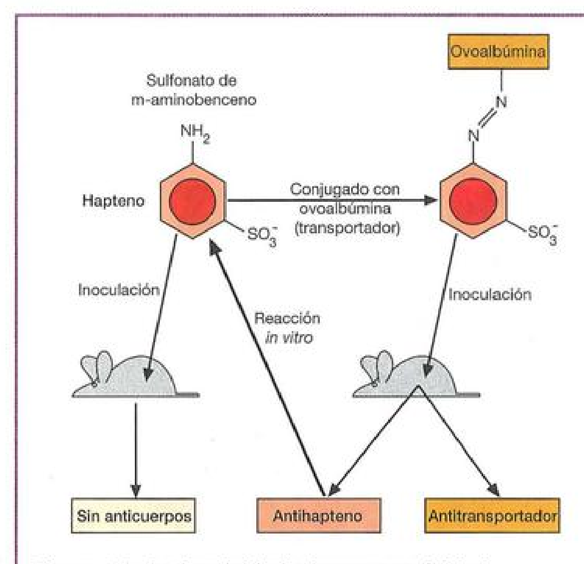


Figura 5.6. Antigenicidad e inmunogenicidad.

Si se inyecta a un animal una molécula de hapteno pequeña y libre, no induce la formación de anticuerpos. Sin embargo, pueden obtenerse anticuerpos de alta afinidad, específicos para el hapteno libre, cuando se inyecta el hapteno conjugado con una molécula transportadora proteica como la ovoalbúmina.

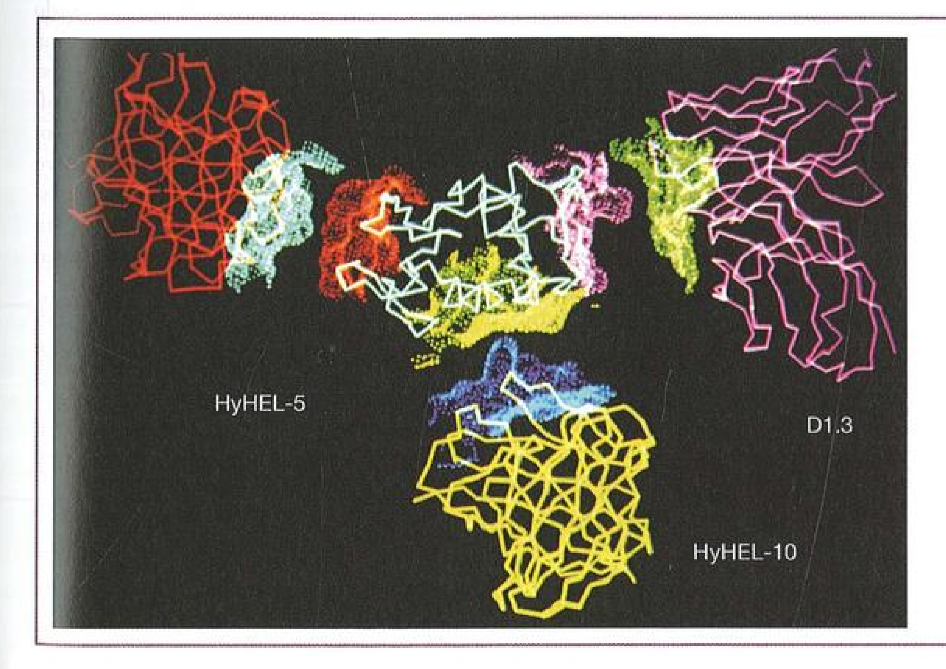


Figura 5.7. Tres epítopos en la proteína pequeña lisozima.

Se han determinado las estructuras cristalográficas de la lisozima unida a tres anticuerpos (HyHEL-5, HyHEL-10 y D1.3). En la figura, el fragmento Fv de cada anticuerpo se muestra separado de la lisozima para poner de manifiesto la huella de interacción en cada caso. Los tres epítopos casi no se superponen, y sólo hay una superposición pequeña entre HyHEL-10 y D1.3. (De Davies y col. [1990], *Annual Review of Biochemistry* **59**, 439.)

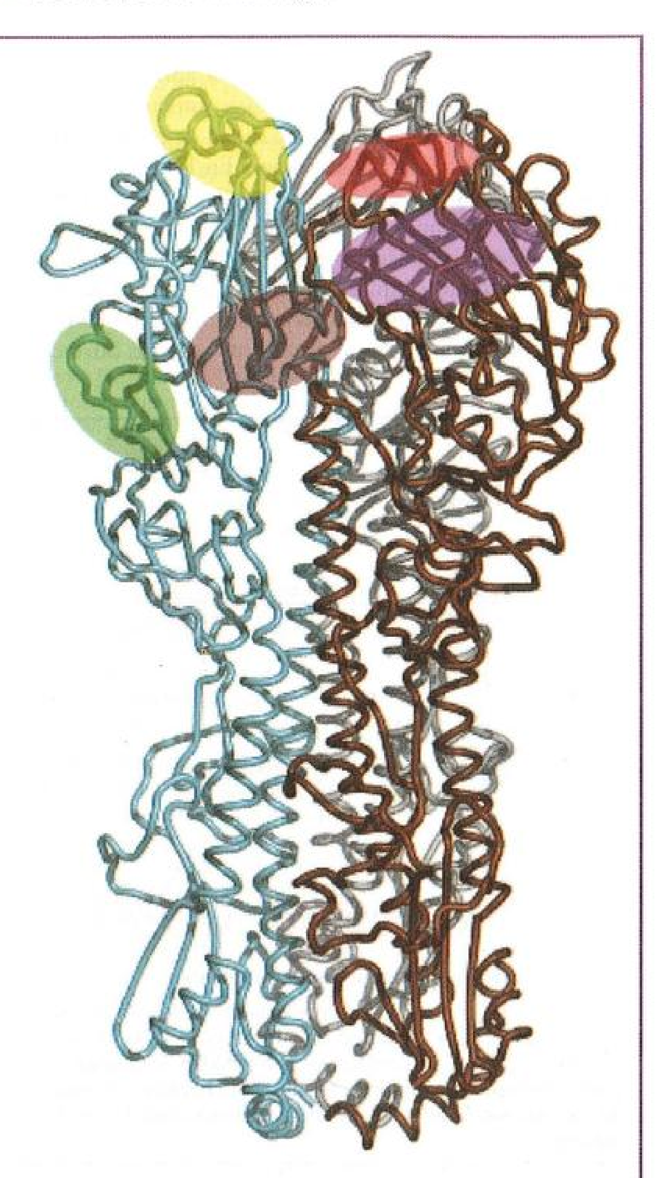


Figura 5.8. Epítopos sobre la superficie de la hemaglutinina (HA) del virus influenza.

Se muestra la estructura de la HA del virus influenza de 1918 causante de la pandemia de gripe que produjo la muerte de 50 millones de personas. La molécula es un homotrímero con monómeros que aparecen de color verdeazulado, gris y pardo. Los homotrímeros forman "espículas" sobre la superficie del virus. Las espículas están ancladas en la membrana viral *(parte inferior de la figura)*. Los residuos de ácido siálico sobre las células diana se unen a los sitios en la parte superior de las espículas y se produce la adherencia del virus a la célula diana en el primer paso de la infección. Se representan cinco epítopos principales sobre HA como óvalos coloreados hacia el extremo de la molécula. Tres de los epítopos *(amarillo, verde y violeta)* incluyen las estructuras destacadas de los bucles. (Cortesía de James Stevens.)

do por la célula B. Un mapa incluso más complejo puede ser elaborado mediante el examen de la mutagénesis del antígeno. En este caso, posiciones únicas en el antígeno pueden ser sustituidas por aminoácidos diferentes (normalmente, alanina y de ahí el término "mutagénesis mediante alanina" [*alanine scanning mutagenesis*]) y es posible determinar los efectos sobre la unión del anticuerpo (véase la Figura 5.10). En este nivel mayor de precisión, es probable que los dos anticuerpos no brinden la misma huella y, por lo tanto, no reconozcan con exactitud el mismo epítopo.

¿Qué es lo que determina la intensidad de la respuesta de anticuerpos contra un epítopo dado sobre una proteína? Parece haber varios factores. Quizás el más significativo sea la accesibilidad del epítopo en la superficie de la proteína. Las asas que sobresalen de la superficie de la proteína plegada tienden a inducir respuestas de anticuerpos particularmente buenas. En la Figura 5.8 se indican los sitios sobre la proteína hemaglutinina (HA) de la superficie del virus de influenza (gripe) que inducen respuestas importantes de anticuerpos. Los anticuerpos contra estas regiones, quizás inducidos por la vacunación, neutralizan el virus y protegen contra la infección. Las mutaciones en estas regiones le permiten al virus "evadir" los anticuerpos neutralizantes e infectar a huéspedes humanos que estaban protegidos contra la forma original del virus. Por ello, las epidemias de gripe reflejan directamente los anticuerpos que se dirigen a ciertos epítopos preferidos. Obsérvese que los epítopos están todos localizados hacia la parte de la HA distante de la membrana del virus y más accesible al anticuerpo. Se advierte también que tres de los epítopos comprenden asas prominentes en la estructura de la HA. La combinación de la capacidad de las asas para adaptarse a los cambios con más facilidad que las características estructurales más compactas en la secuencia de aminoácidos y su situación más favorable para inducir respuestas de anticuerpos determinan la asociación frecuente de las asas con la evasión de la neutralización.

El HIV es otro virus que hace uso de la tendencia del sistema de anticuerpos a responder a las asas variables altamente expuestas sobre la superficie proteica viral. Tras la primoinfección, transcurre cierto tiempo (semanas) hasta que los anticuerpos neutralizantes alcanzan un nivel donde comienzan a inhibir la replicación viral. De manera característica, estos anticuerpos se producen contra las asas expuestas del virus. Mientras son inducidos estos anticuerpos, el virus se diversifica, es decir, se convierte en un enjambre de virus relacionado a través de errores asociados con la transcripción del DNA al RNA de este retrovirus. Entre ese sinnúmero de virus, se encuentra aquel que posee cambios de la secuencia en los epítopos hacia los cuales está dirigida la respuesta de anticuerpos neutralizantes que le permiten evadir la respuesta. Este nuevo virus se torna predominante. Por último, se monta una respuesta contra ese virus y surge un segundo virus nuevo, y así sucesivamente. La respuesta de anticuerpos "persigue" al virus a lo largo de los años, pero nunca logra su control.

Un punto digno de destacar es que las asas accesibles sobre las estructuras proteicas tienden a ser flexibles. Por consiguiente, la dominancia del epítopo también se asocia con las regiones flexibles de un antígeno proteico.

Termodinámica de las interacciones anticuerpo-antígeno

La interacción entre anticuerpo y antígeno es reversible y puede ser descrita por las leyes de la termodinámica. En particular, puede estudiarse la reacción

$$\text{Ac} + \text{Ag} \rightleftharpoons \text{complejo Ac–Ag}$$

y establecerse la posición de equilibrio en diferentes condiciones. En otros términos, se puede estimar la cantidad de anticuerpo unido al antígeno en condiciones diferentes. Ésta es una información crucial. Si el anticuerpo recubre un virus, es probable que el virus no pueda ingresar en la célula diana y la infección será evitada. Si el anticuerpo puede adherirse a una célula bacteriana en una densidad bastante alta, entonces el complemento puede ser activado y la célula será destruida.

La posición de equilibrio se describe por la constante de asociación o de unión, K_a:

$$K_a = [\text{complejo Ac–Ag}]/[\text{Ac}] \times [\text{Ag}]$$

donde los corchetes indican concentraciones molares. Por lo tanto, las unidades de K_a son moles por litro (M), o 1/M. Si K_a es una cifra grande, el equilibrio está muy hacia la derecha y se ve favorecida la formación del complejo Ac–Ag. De modo característico, los anticuerpos de alta afinidad tienen valores de K_a del orden de 10^{-8}–10^{-10} M. Algunos investigadores prefieren concebir la unión en términos de una constante de disociación, K_d, definida simplemente como $1/K_a$ y con unidades de M. Los anticuerpos de alta afinidad tienen valores de K_d del orden de 10^{-8}–10^{-10} M. Dado que una $K_d = 10^{-9}$ M corresponde a 1 nM, los anticuerpos de alta afinidad a veces se denominan "ligadores nM". Los anticuerpos de afinidad moderada, como las IgM, a menudo se designan ligadores μM (K_d = 1 μM).

Otra manera de considerar la ecuación de unión es: si la mitad de los sitios disponibles del antígeno están ocupados por el anticuerpo, entonces [Ag] = [complejo Ac–Ag] y K_a = 1/[Ac] o K_d = [Ac]. En otras palabras, K_d es igual a la concentración del anticuerpo en la cual la mitad de éste se halla unido. Por ejemplo, un anticuerpo con unión nM comenzará a formar un complejo con el antígeno cuando su concentración se encuentra en el rango nanomolar. El anticuerpo se unirá muy poco si sólo está en el rango de concentraciones picomolar (10^{-12}), pero se unirá de manera muy eficaz en el rango μM . De manera similar, un anticuerpo μM será eficaz en el rango de concentración μM, pero no en el nM. Para la IgG, nM es aproximadamente 0,15 μg/mL y mM es 150 μg/mL. La concentración promedio de IgG en el suero es de alrededor de 12 mg/mL. Queda claro entonces que, si se requiere que los anticuerpos estén presentes en el suero en concentraciones en las cuales van a ser eficaces para unir el antígeno, mucha más especificidades pueden cubrirse por un conjunto de anticuerpos de unión nM (alta afinidad) que por un conjunto de anticuerpos de unión μM. En realidad, éste parece ser el modo en que funciona en gran medida la naturaleza fuera de los protocolos de inmunización extrema en los modelos animales. Así es como la mayoría de nosotros estamos protegidos (al menos contra la reinfección tras una infección primaria o la vacunación) por los anticuerpos de alta afinidad en concentraciones relativamente moderadas.

En la descripción anterior, se acepta implícitamente que las interacciones entre el anticuerpo y el antígeno son monovalentes, que incluyen sólo un brazo Fab de la molécula del anticuerpo. Pero, en realidad, pueden ser multivalentes, lo cual de alguna manera complica el problema aun cuando los puntos principales permanecen intactos. Se volverá a la multivalencia más adelante.

Las constantes de unión de las interacciones anticuerpo-antígeno a menudo se estiman por mediciones con el método ELISA, si bien ahora pueden determinarse con cierta precisión mediante técnicas como la resonancia de plasmón superficial y la calorimetría isotérmica. Para la unión de anticuerpos a antígenos sobre la superficie celular, la citometría de flujo puede dar una buena estimación de las afinidades de unión.

La constante de unión para una reacción está directamente relacionada con la energía que acompaña la reacción por la ecuación:

$$\Delta G = -RT \ln K_a$$

donde ΔG es la energía libre de la reacción, R es la constante de los gases y T es la temperatura en K. ln es el logaritmo natural = $2{,}303 \times \log_{10}$. Por lo tanto, ΔG es otra manera de describir en qué medida una reacción se desviará a la izquierda o a la derecha del equilibrio en ciertas condiciones. Si $K_a = 10^9\ \text{M}^{-1}$, $\Delta G \sim -12$ kcal/mol; si $K_a = 10^6\ \text{M}^{-1}$, $\Delta G \sim -8$ kcal/mol. La ventaja de considerar ΔG es que puede ayudar a comprender las fuerzas moleculares que conducen a la interacción del anticuerpo y el antígeno. Así, la energía libre de una reacción (ΔG) es el efecto neto de contribuciones de la entalpía (ΔH) y la entropía (ΔS):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

La entalpía es el calor de la reacción; cuanto más calor se produce en la reacción (ΔH negativa), más será facilitada (ΔG negativa). Cuando una reacción requiere calor, ésta se dificulta. Cuanto más entropía (o desorden) se produce por la reacción (ΔS positiva), más se favorece. Por ejemplo, una interacción anticuerpo-antígeno se favorecería por la formación de un enlace de H entre las dos moléculas de 1-3 kcal/mol, aproximadamente. Un puente salino proporcionaría una cantidad similar o algo mayor de energía. La reacción también podría favorecerse por la unión de las superficies hidrófobas del anticuerpo y el antígeno porque se liberaría el agua dispuesta alrededor de las caras hidrófobas para aumentar la entropía. Se estima que 1 nm^2 de superficie hidrófoba generan cerca de 2,5 kcal/mol de energía de unión. Algunas de las fuerzas que dirigen las interacciones proteína-proteína se resumen en la Figura 5.9.

A menudo, el epítopo se considera en términos de la región del antígeno con la cual toma contacto el anticuerpo, imagen proporcionada por los estudios de la estructura cristalográfica de los complejos anticuerpo-antígeno. Sin embargo, debe tenerse presente que la observación de los contactos entre anticuerpo y antígeno en una estructura cristalográfica no revela las contribuciones de las interacciones individuales a la energía de unión global. Esto puede hacerse al determinar los efectos de la mutagénesis de barrido (véase antes) sobre la unión del anticuerpo medido. Los datos disponibles sugieren

Figura 5.9. Interacciones proteína-proteína.

a) Atracción electrostática entre grupos iónicos con carga opuesta en las dos cadenas laterales de la proteína ilustrada por un grupo amino ionizado (NH_3^+) en la lisina de una proteína y un grupo carboxilo ionizado ($-COO^-$) en el glutamato en la otra. La fuerza de atracción es inversamente proporcional al cuadrado de la distancia entre las cargas. Así, cuando las cargas se aproximan, la fuerza de atracción aumenta de manera considerable: si se divide en dos la distancia de separación, la fuerza de atracción se cuadriplica. Además, dado que la constante dieléctrica del agua es sumamente alta, la eliminación de las moléculas de agua a través de la contigüidad de los residuos que interactúan aumentaría en gran medida la fuerza de atracción. Los dipolos en el antígeno y en el anticuerpo también se atraen entre sí. Asimismo, pueden generarse fuerzas electrostáticas por reacciones de transferencia de cargas entre el anticuerpo y el antígeno; por ejemplo, un residuo de proteína que dona un electrón como el triptófano podría ceder un electrón a un grupo como el dinitrofenilo (DNP), que es un aceptor de electrones, por lo cual se crea una carga efectiva +1 en el anticuerpo y −1 en el antígeno. b) La formación de enlaces de hidrógeno entre dos proteínas, que implica la formación de enlaces de hidrógeno reversibles entre grupos hidrófilos, como OH, NH_2 y COOH, depende en gran medida de la aproximación estrecha de dos moléculas que contienen esos grupos. Si bien los enlaces de H son relativamente débiles porque en esencia son de naturaleza electrostática, la eliminación de agua de las cadenas laterales que reaccionan aumentaría en alto grado la energía de unión a través de la importante reducción en la constante dieléctrica. c) Los grupos hidrófobos no polares como la valina, la leucina y la isoleucina de las cadenas laterales tienden a asociarse en un medio acuoso. La fuerza que interviene en esta interacción hidrófoba proviene del hecho de que el agua en contacto con moléculas hidrófobas, con las que no puede formar enlaces H, se asociará con otras moléculas de agua; pero el número de configuraciones que permiten formar enlaces H no sería tan grande como el que se produce cuando ellas están totalmente rodeadas por otras moléculas de agua, es decir, la entropía es más baja. Cuanto mayor es la zona de contacto entre el agua y las superficies hidrófobas, menor es la entropía y mayor el estado de energía. Por lo tanto, si los grupos hidrófobos en dos proteínas se juntan de modo que excluyen moléculas de agua entre sí, la superficie neta en contacto con el agua se reduce y las proteínas adquieren un estado de energía más bajo que cuando están separadas (en otras palabras, existe una fuerza de atracción entre ellas). d) Fuerza de Van der Waals: la interacción entre los electrones en las órbitas externas de dos macromoléculas diferentes puede ser considerada (para simplificar) como la atracción entre dipolos oscilantes inducidos en las dos nubes de electrones. La naturaleza de esta interacción es difícil de describir en otros términos que no sean matemáticos; pero se la relacionó con una perturbación temporaria de electrones en una molécula que forma efectivamente un dipolo e induce una perturbación dipolar en la otra molécula, por lo cual los dos dipolos establecen una fuerza de atracción entre sí; a medida que los electrones desplazados se balancean a través de la posición de equilibrio y más allá, los dipolos oscilan. La fuerza de atracción es inversamente proporcional a la séptima potencia de la distancia y, como resultado, ésta se eleva con mucha rapidez a medida que se aproximan las moléculas que interactúan.

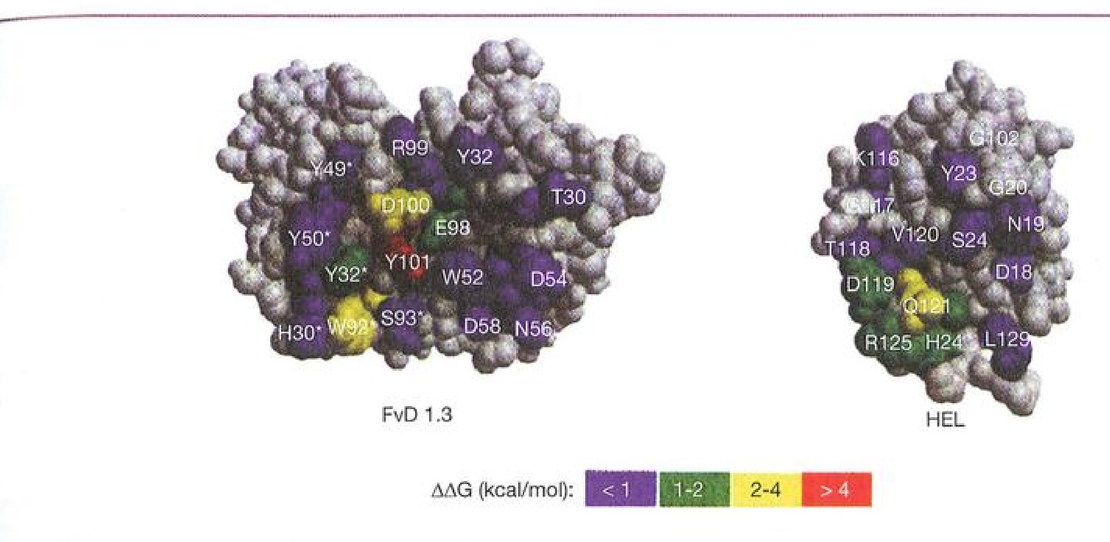


Figura 5.10. Mapa energético de una interfaz anticuerpo-antígeno.

El anticuerpo D1.3 (cadena simple Fv [sFv] mostrado aquí) se une con alta afinidad a la lisozima de la clara de huevo de gallina (HEL) y se ha resuelto la estructura cristalográfica del complejo (véase la Figura 5.7). La contribución energética de los residuos del anticuerpo y del antígeno que se ponen en contacto puede ser estimada al sustituir el residuo con el residuo relativamente "neutro" alanina. El efecto puede expresarse en términos de la pérdida de energía libre de unión para la interacción en la sustitución de alanina ($\Delta\Delta G$). Un valor positivo grande para $\Delta\Delta G$ indica que la sustitución de alanina ha tenido un fuerte efecto perjudicial en la unión y que el residuo sustituido forma un contacto crucial en la interfaz entre el anticuerpo y el antígeno. Es evidente que la existencia de más residuos de contacto, en particular en el anticuerpo, contribuye poco a la energía de unión global. Hay "puntos calientes" claros tanto en el anticuerpo como en el antígeno, y los residuos de los puntos calientes de la interacción sobre el lado del anticuerpo se corresponden con los situados en el lado del antígeno. (De Sundberg y Mariuzza [2002], *Advances in Protein Chemistry* **61**,119.)

que sólo algunas interacciones productivas ("puntos calientes") dominan la energía de unión; muchas interacciones son neutras o perjudiciales para la unión, incluso en un par anticuerpo-antígeno de alta afinidad. En la interacción de un anticuerpo con la lisozima, sólo cerca de la tercera parte de los residuos del anticuerpo que hacen contacto realmente contribuyen significativamente a la unión neta (Figura 5.10).

La sustitución en un solo residuo de antígeno o de anticuerpo puede ser decisiva en la unión neta del anticuerpo con el antígeno. Esto puede apreciarse intuitivamente. Si un residuo voluminoso remplaza un pequeño epítopo reconocido, entonces puede alterarse la interfaz completa anticuerpo-antígeno. Es característico que los patógenos evadan los anticuerpos por mutaciones en un número pequeño de residuos críticos.

Multivalencia en las interacciones anticuerpo-antígeno

La unión de un fragmento Fab monovalente con un antígeno monovalente puede analizarse directamente como se describió antes. Esto también sería válido para la molécula de IgG divalente correspondiente que interactúa con el antígeno monovalente. Sin embargo, cuando se considera una IgG divalente (o anticuerpo multivalente de cualquier clase) que interactúa con un antígeno multivalente, el análisis de la unión se torna más complejo.

Considérese la unión de la IgG con un antígeno que se expresa como copias múltiples sobre una superficie celular. Si las moléculas de antígeno están espaciadas de manera adecuada y en una orientación apropiada, la IgG puede ser capaz de unirse en forma divalente (Figura 5.11). Esto llevará a una afinidad más alta (a menudo denominada avidez o afinidad funcional) de la IgG por la superficie celular que por el Fab correspondiente. El "efecto de bonificación" de la unión divalente es entendible por intuición en términos de la tendencia de la IgG divalente a adherirse mejor a la superficie celular que el fragmento Fab correspondiente. Para que el Fab "se desprenda" de la célula, debe romperse una serie de interacciones entre un solo sitio de combinación del anticuerpo y el antígeno. Para que se desprenda la IgG, las interacciones en dos sitios de combinación del anticuerpo deben romperse en forma simultánea, un acontecimiento menos probable. El efecto de la bonificación puede ser considerado en términos de ΔG. La unión divalente producirá un aumento mayor de ΔH debido al uso de dos sitios de combinación del anticuerpo. Sin embargo, se pagará un precio de la entropía al reprimir los brazos Fab de la molécula de IgG. El efecto neto en la ΔG suele ser bastante modesto y produce un aumento de la afinidad del orden de 1 a 100 veces como efecto de bonificación. También debe tenerse presente que la IgG puede unirse de modo monovalente incluso a un antígeno multivalente si las moléculas del antígeno están espaciadas u orientadas de modo inadecuado. La IgM es decavalente para el antígeno, lo que en teoría podría producir un efecto de bonificación enorme en la afinidad funcional. En la práctica, las IgM tienden a ser ligadores con afinidad bastante moderada, lo cual sugiere un uso limitado de la multivalencia o un precio alto de la entropía pagado por la unión multivalente.

Uno de los efectos más notables de la interacción de un anticuerpo multivalente puede verse en la neutralización de

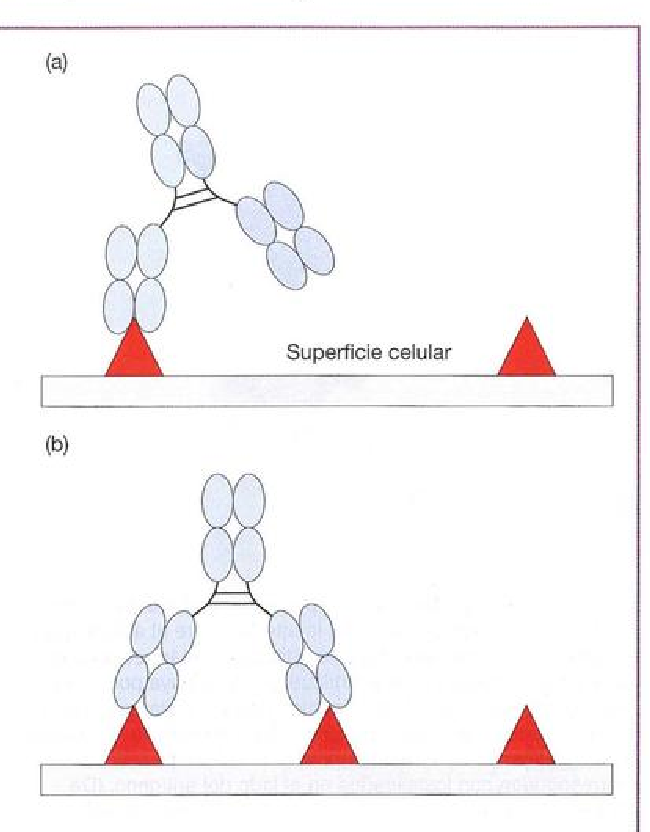


Figura 5.11. Unión del anticuerpo divalente a una superficie celular.

La afinidad de un anticuerpo que puede unirse de manera divalente a un antígeno multivalente b), como puede hallarse en una superficie celular, está aumentada en relación con la de un anticuerpo que sólo se puede unir en forma monovalente a).

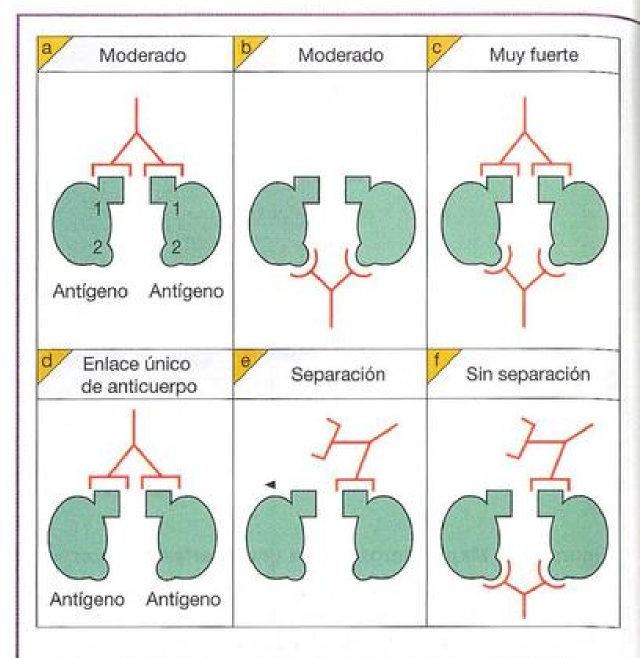


Figura 5.12. Efecto de bonificación de la unión multivalente en la neutralización del anticuerpo de una molécula soluble, como una toxina.

a-c) Se observó que dos anticuerpos que se unen a epítopos no superpuestos sobre un antígeno soluble pueden mostrar una afinidad muy aumentada si se la compara con la de los anticuerpos utilizados en forma separada (unión cooperativa). d,e) Si sólo un anticuerpo está presente, la disociación del complejo requiere únicamente que la interacción entre un sitio de combinación del anticuerpo y su epítopo se rompa. f) Si dos anticuerpos están unidos con el antígeno y se pierde la interacción entre un sitio de combinación del anticuerpo-epítopo, como se muestra, el complejo permanece junto, y el brazo Fab liberado está en posición para volver a formar un complejo. En efecto, los valores k_{off} para los dos anticuerpos disminuyen en el complejo, y si un brazo de Fab se desplaza, el valor k_{on} aumenta en relación con la situación del anticuerpo con un enlace único.

toxinas. Los neurotoxinas botulínicas causan la enfermedad humana paralítica conocida como botulismo y son consideradas por su potencial importante como amenaza bioterrorista. Se han generado anticuerpos monoclonales a partir de colecciones de fagos contra la toxina. Ningún mAb protegió por sí solo a los ratones contra el desafío mortal con la toxina. Sin embargo, una combinación de tres mAb los protegió contra un desafío enorme con toxina. En parte, la diferencia podría atribuirse a un efecto de bonificación de la multivalencia (unión cooperativa de los anticuerpos con más de una molécula de toxina) que aumentó las afinidades funcionales de los anticuerpos en el rango pM desde el rango nM en los mAc individuales. Los orígenes de este efecto se ilustran para una combinación de dos mAc en la Figura 5.12.

Especificidad y reactividad cruzada de los anticuerpos

La especificidad es un concepto que suele analizarse en el contexto de los anticuerpos. Puede tener significados diferentes. A veces, se utiliza para indicar simplemente que el anticuerpo tiene alta afinidad por el antígeno. Por lo general, esto significa que el anticuerpo presenta un sitio de combinación que se ajusta muy bien a un epítopo del antígeno y que es muy poco probable que otras formas se adapten en la misma medida. Por consiguiente, es específico para el antígeno. Sin embargo, quizá otras formas pueden adaptarse, en especial si están relacionadas con el epítopo antigénico en composición o en características químicas. Lo más probable es que las otras moléculas se reconozcan con menor afinidad. Es importante recordar de lo analizado antes que los anticuerpos serán funcionales en concentraciones próximas a sus valores de K_d. Así, si un anticuerpo tiene una afinidad nM por un antígeno dado y está presente en concentraciones nM in vivo, es poco probable que las reactividades cruzadas con otros antígenos en el rango sub-μM sean importantes desde el punto de vista funcional.

Un segundo significado en relación con la "especificidad" es la capacidad de diferenciar entre moléculas. Esto claramente se superpone con la descripción anterior, pero tam-

Avances y descubrimientos 5.1—Restricción de la reactividad de las células T por el CMH

El hecho de que el CMH, que fue reconocido durante mucho tiempo como un elemento de control dominante en el rechazo de injertos de tejidos, pasara a ocupar el escenario principal de las respuestas centrales de las células T ha suscitado fascinación y gran complacencia en los inmunólogos, casi como si lentamente se hubiese develado un gran plan universal.

Una de las observaciones fundamentales que contribuyeron a elevar el CMH a esta posición privilegiada fue el notable descubrimiento de Doherty y Zinkernagel, por el cual merecieron el premio Nobel, de que las células T citotóxicas tomadas de un individuo en etapa de recuperación de una infección viral sólo destruían las células infectadas por virus que comparten un haplotipo del CMH con el huésped. Estos investigadores hallaron que las células T citotóxicas provenientes de ratones con el haplotipo H-2^d infectadas con el virus de la coriomeningitis linfocítica podían destruir las células infectadas con virus provenientes de cualquier cepa H-2^d, pero no las células con haplotipo H-2^k u otro haplotipo H-2. El experimento recíproco con ratones H-2^k muestra que esto no es sólo una propiedad especial asociada con el H2^d (Figura A5.1.1a). Los estudios con cepas recombinantes (véase el Cuadro 4.4) señalaron a las moléculas de clase I del CMH como el elemento de restricción y esto fue confirmado por la demostración de que los anticuerpos contra esas moléculas bloquean la reacción de destrucción.

El mismo fenómeno se observó en reiteradas ocasiones en los seres humanos. Los individuos HLA-A2 que se recuperan de la gripe tienen células T que matan las células diana HLA-A2 infectadas por el virus, pero no células con especificidad de un tipo tisular HLA-A diferente (Figura A5.1.1b). Adviértase cómo la citotoxicidad podría ser inhibida por un antisuero específico para el donante de tipo HLA-A, pero no por el antisuero para la forma alélica HLA-A1 o el marco de clase II del HLA-DR. De llamativa importancia es la incapacidad de los anticuerpos contra la nucleoproteína para bloquear el reconocimiento de las células T aun cuando en estos estudios se sabía que la especificidad de las células T estaba dirigida directamente hacia su antígeno. Como los anticuerpos reaccionan con la nucleoproteína en su forma nativa, la conformación del antígeno presentado a la célula T debe ser bastante diferente.

Al mismo tiempo, una serie comparable de experimentos establecieron el papel de las moléculas de la clase II del CMH en la presentación del antígeno a las células T *helper*. En un comienzo, Shevach y Rosenthal demostraron que la proliferación de linfocitos contra el antígeno *in vitro* podía ser bloqueada por antisueros elaborados partir de dos cepas de cobayos que contendrían anticuerpos contra el CMH de los linfocitos que generaron la respuesta. La evidencia más rigurosa proviene del tipo de experimento en el cual un clon proliferante de células T como respuesta a la ovoalbúmina en células presentadoras de antígenos con fenotipo H-2A^b no responde si el antígeno se presenta en el contexto del H-2A^k. Sin embargo, cuando las células presentadoras de antígenos H-2A^k son transfectadas con los genes que codifican H-2A^b, se comunican de manera eficaz con las células T (Figura A5.1.2).

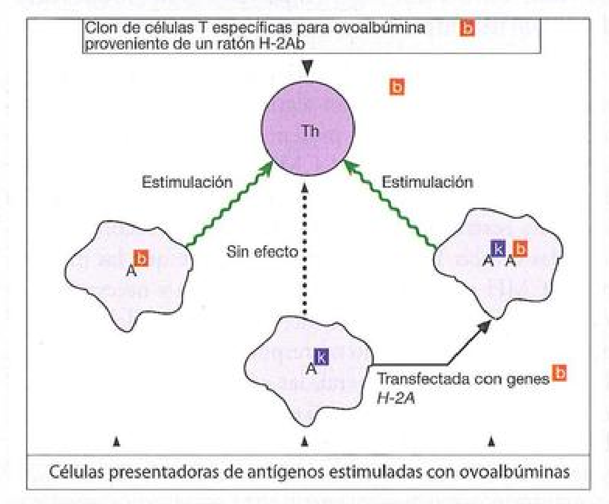


Figura. A5.1.2. El clon de células T sólo responde con proliferación *in vitro* cuando las células presentadoras de antígenos (p. ej., macrófagos) estimuladas con ovoalbúmina expresan las mismas moléculas de clase II del CMH.

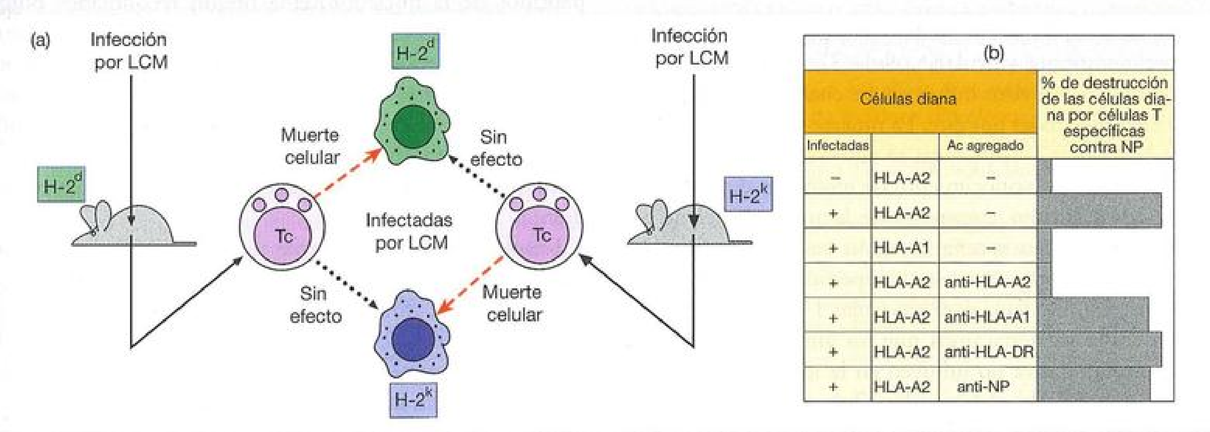


Figura A5.1.1. La destrucción de las células T está restringida por el haplotipo del CMH de las células diana infectadas por virus.

a) Destrucción restringida por el haplotipo de células diana infectadas por el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCM) a cargo de las células T citotóxicas. Las células *killer* provenientes de huéspedes H-2^d sólo destruyen células infectadas H-2^d, no aquellas de haplotipo H-2^k, y a la inversa. b) Las células diana infectadas con la nucleoproteína (NP) del virus de la gripe son destruidas por células T específicas provenientes de un donante HLA-A2 (véase p. 101 para la nomenclatura del CMH de seres humanos). La destrucción estuvo restringida a las células diana HLA-A2 y sólo fue inhibida por anticuerpos contra A2, no contra A1, ni contra las moléculas de clase II del HLA-DR o el antígeno NP nativo.

bién podría aplicarse a los anticuerpos con menor afinidad. Así, en estudios de genómica existe una demanda de anticuerpos que puedan distinguir determinadas proteínas de muchas otras e identificar estas proteínas específicas en una variedad de ensayos. Esto no requiere necesariamente una alta afinidad, pero sí una buena discriminación. Al respecto, se han utilizado con éxito anticuerpos de afinidad moderada seleccionados a partir de colecciones de fagos.

Qué reconocen las células T

En varias ocasiones, se mencionó que el receptor de las células T αβ reconoce" el antígeno en la superficie de las células asociadas con una molécula de clase I o II del CMH. Ahora es el momento de profundizar en esta afirmación.

La restricción del haplotipo revela la necesidad de la participación del CMH

Se estableció de un modo fehaciente que las células T provistas de receptores αβ, con algunas excepciones, sólo responden cuando las células presentadoras de antígeno expresan el mismo haplotipo del CMH que el huésped a partir del cual derivaron las células T (Avances y descubrimientos 5.1). Esta **restricción por el haplotipo** en el reconocimiento de las células T indica inequívocamente que las moléculas del CMH participan de manera estrecha y necesaria en la interacción entre antígeno-célula portadora y el linfocito T específico para el antígeno correspondiente. También aprendimos que, en forma general, las células T citotóxicas reconocen el antígeno en el contexto de las moléculas de clase I del CMH, y las células T *helper* interactúan cuando el antígeno se asocia con las moléculas de clase II. Entonces, si aceptamos la participación del CMH en el reconocimiento de las células T, ¿qué sucede con el antígeno?

Las células T reconocen una secuencia peptídica lineal del antígeno

En el recuadro de Avances y descubrimientos 5.1 se analizan los experimentos que vinculan a células T específicas contra las nucleoproteínas del virus influenza, las cuales podrían destruir a las células infectadas por éste. La muerte se produce después de que las células T citotóxicas se adhieren firmemente a su diana a través del reconocimiento de moléculas específicas de superficie. Es curioso entonces que la nucleoproteína, que carece de una secuencia señal o región transmembrana y por lo tanto no puede expresarse en la superficie celular, sea capaz de funcionar como diana para las células T citotóxicas, en particular porque ya destacamos que los anticuerpos contra la nucleoproteína nativa no influyen en la reacción de destrucción (Figura A5.1.1b). Además, las células **no infectadas** no se convierten en diana de las células T citotóxicas cuando se agrega nucleoproteína entera al sistema de cultivo. En cambio, si se añade una serie de péptidos cortos con secuencias derivadas de la estructura primaria de la nucleoproteína, las células no infectadas pueden transformarse en susceptibles al ataque citolítico de las células T (Figura 5.13).

Así se reveló el secreto del reconocimiento del antígeno por la célula T. La realidad sorprendente es que las células T

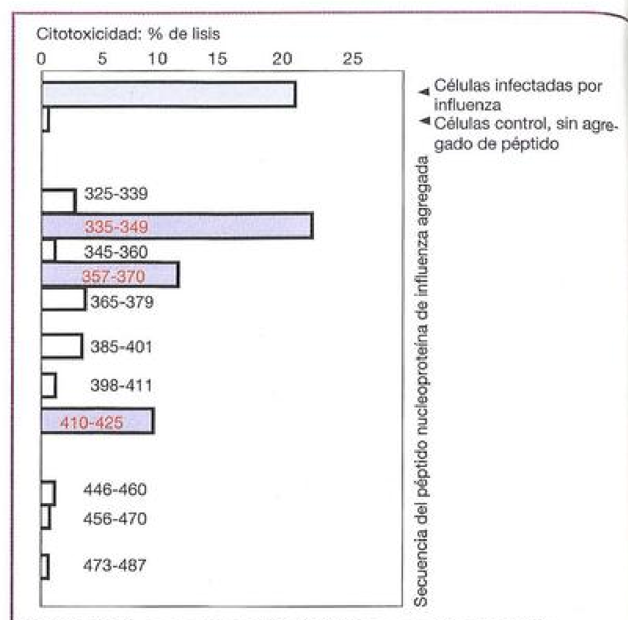


Figura 5.13. Las células T citotóxicas de un donante humano matan las células diana no infectadas en presencia de péptidos cortos de la nucleoproteína del virus influenza.

Los péptidos indicados se agregaron a linfoblastos singénicos (es decir, del mismo donante que las células T) activados con mitógenos y marcados con ^{51}Cr, y se evaluó la citotoxicidad por la liberación de ^{51}Cr con una relación células *killer*: células diana de 50:1. Los tres péptidos indicados en rojo indujeron una destrucción adecuada. Los blastos infectados con el virus influenza de una cepa diferente se utilizaron como control positivo. (Reproducido con autorización de Townsend A.R.M. y col. [1986], *Cell* **44**, 959. Copyright © 1986 por Cell Press.)

reconocen péptidos lineales derivados del antígeno, y ésta es la razón por la cual los anticuerpos elaborados contra la nucleoproteína en su conformación nativa tridimensional no inhiben la muerte celular. Adviértase que sólo ciertos péptidos de la nucleoproteína fueron reconocidos por las células T policlonales en la población del donante y éstos serán considerados como epítopos de las células T. Cuando clones de idéntica especificidad derivan de estas células T, cada clon reacciona sólo con uno de los péptidos; en otras palabras, a semejanza de lo que sucede con los clones de células B, cada clon es específico para el epítopo correspondiente.

Resultados completamente análogos se obtienen cuando los clones de células **T-*helper*** son estimulados por células presentadoras de antígenos a las que se les agregaron ciertos péptidos derivados del antígeno original. De nuevo, mediante la síntesis de una serie de estos péptidos, el epítopo de las células T puede mapearse con cierta precisión.

La conclusión es que la **célula T reconoce tanto el CMH como el péptido**, y en la actualidad sabemos que el péptido que actúa como epítopo de la célula T se dispone a lo largo de la hendidura formada por las hélices α y el piso de la hoja plegada β de los dominios de clase I y clase II más externos (véase la Figura 4.17), pero ¿cómo llega hasta allí?

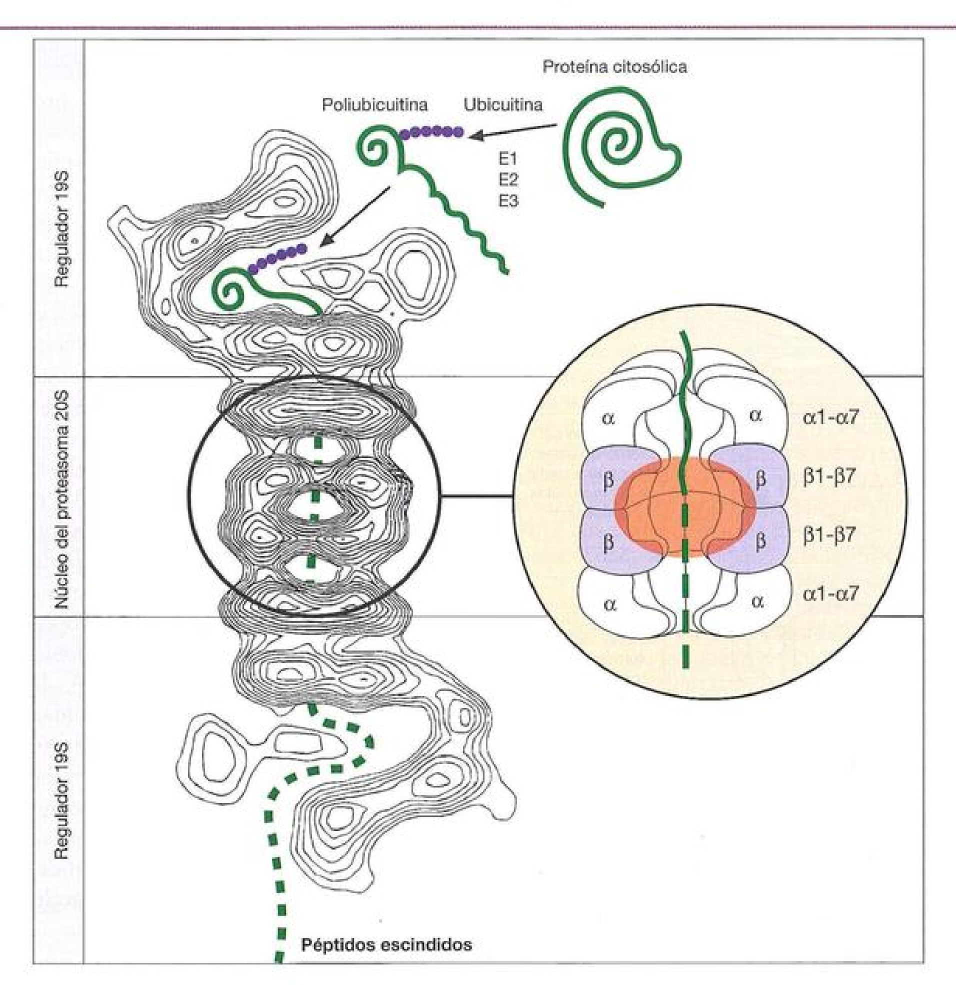


Figura 5.14. Escisión de las proteínas citosólicas por el proteasoma.

Las proteínas citosólicas se convierten en poliubicuitinadas en una reacción dependiente del ATP en la que la enzima E1 forma un tioléster con el C-terminal de la ubicuitina y luego la transfiere a una de 10 a 15 proteínas transportadoras de ubicuitina E2 diferentes. El C-terminal de la ubicuitina es conjugado después por una de las varias enzimas proteinligasas de ubicuitina E3 a un residuo de lisina del polipéptido. En estos procesos, hay especificidad en cuanto a que las enzimas E2 y E3 tienen preferencias por proteínas diferentes. La proteína citosólica ubicuitinada se une al regulador 19S que contiene ATPasa, donde el ATP conduce la cadena de proteína no plegada al interior de la estructura cilíndrica del núcleo 20S del proteasoma, formado por 28 subunidades dispuestas en cuatro anillos apilados. Los dos anillos externos están constituidos por siete subunidades α α_1–α_7 mientras que los dos anillos de la cámara hidrolítica central están formados cada uno por siete subunidades β diferentes β_1–β_7. Dentro de la cámara hidrolítica, la proteína se halla expuesta a la actividad proteolítica *(sombreado rojo)*. Interviene un novedoso mecanismo catalítico en el que el residuo nucleofílico, que ataca los enlaces peptídicos, es el grupo hidroxilo situado en el residuo N-terminal de treonina de las subunidades β. Hay tres subunidades activas desde el punto de vista catalítico, β_1, β_2 y β_5, y pueden actuar sobre un amplio espectro de polipéptidos. Sin embargo, en un sentido general, la subunidad β_1 tiene actividad similar a la caspasa e hidroliza polipéptidos después de residuos ácidos; β_2 es "similar a la tripsina" y escinde después de residuos básicos; y β_5 es "similar a la quimotripsina" en lo que se refiere a su actividad de hidrolizar los péptidos después de residuos hidrófobos grandes. Las moléculas β_1i, β_2i y β_5i asociadas con el inmunoproteosoma inducida por IFNγ muestran especificidades similares, pero en general producen péptidos más largos, con escisión posacídica reducida y mayor actividad de quimotripsina y tripsina cuando se comparan con sus equivalentes destinados al mantenimiento interno del proteasoma. (Basado en Peters J. M. y col. [1993], *Journal of Molecular Biology* **234**, 932-937 y Rubin D.M. y Finley D. [1995] *Current Biology* **5**, 854-858.)

Procesamiento del antígeno intracelular para la presentación por las moléculas de clase I del CMH

Dentro de las estructuras proteolíticas de escondite del citosol, los proteasomas son los que participan en el intercambio habitual y en la degradación celular de las proteínas (Figura 5.14). Las proteínas citosólicas destinadas a la presentación del antígeno, como las proteínas virales, se degradan a péptidos mediante una vía metabólica que involucra estas estructuras, y con posterioridad son cortados por proteasas citosólicas como la leucina aminopeptidasa y la aspartil aminopeptidasa. Además de las proteínas ya presentes en el citosol, una proporción de proteínas unidas a la membrana y proteínas secretorias es transportada de nuevo desde el retículo endoplasmático (RE) al citosol. Este proceso puede

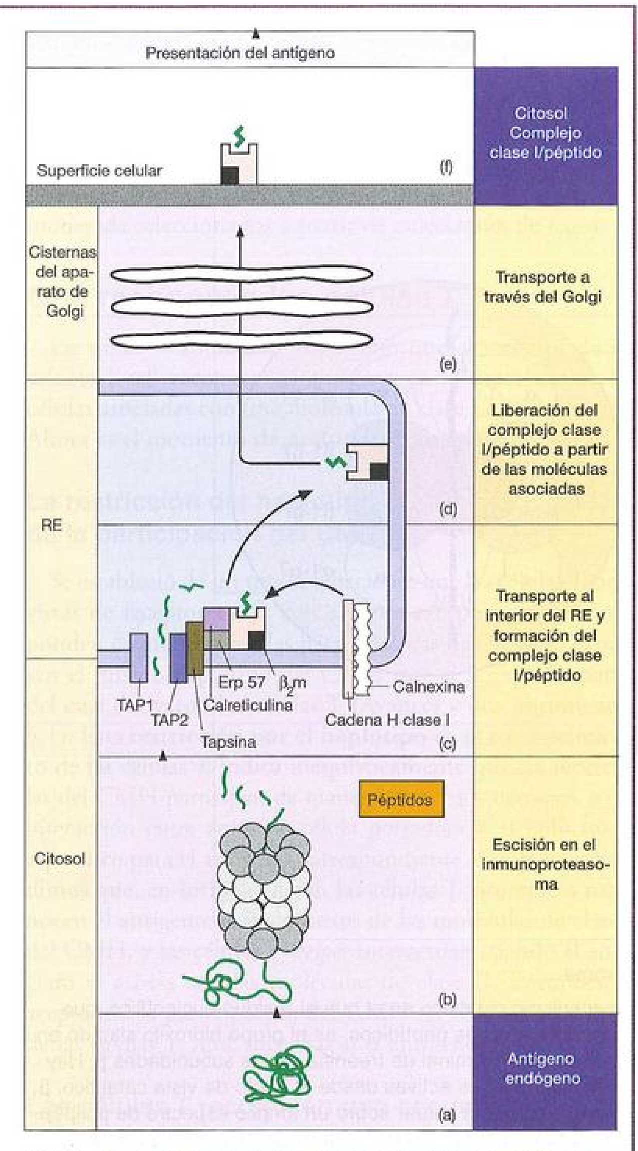


Figura 5.15. Procesamiento y presentación del antígeno endógeno por la clase I del CMH.

a) Las proteínas citosólicas son degradadas por el complejo proteasoma b) en péptidos, que son transportados al interior del retículo endoplasmático (RE) por los miembros de los transportadores asociados con el procesamiento del antígeno TAP1 y TAP2 que pertenecen a la familia ABC de proteínas de transporte dependiente del ATP c). Bajo la influencia del complejo de carga de péptidos (PLC; que comprende TAP1/2 junto con calreticulina, tapasina y ERp57), los péptidos son cargados en la hendidura de las moléculas de clase I del CMH unidas a la membrana. ERp57 isomeriza los enlaces disulfuro para asegurar la conformación correcta de la molécula de clase I. La tapasina forma un puente entre TAP1/2 y los otros componentes PLC y se une en forma covalente a ERp57, que a su vez está unido en forma no covalente con la calreticulina. Después de cargar el péptido se libera el complejo péptido-CMH del PLC d), atraviesa el aparato de Golgi e) y aparece en la superficie celular f) listo para la presentación a los receptores de las células T. Las células mutantes deficientes en TAP1/2 no ceden los péptidos a las moléculas de clase I y no pueden funcionar como dianas para las células T citotóxicas.

estar mediado por el canal multimolecular Sec61. Las proteínas que experimentan retrotranslocación desde el RE al citosol pueden ser procesadas para la presentación por las moléculas de clase I, al igual que las proteínas provenientes de las mitocondrias. Antes del procesamiento, las proteínas se unen de manera covalente a diversas moléculas de ubicuitina de 7,5 kDa en un proceso dependiente del ATP. La poliubicuitinación tiene como dianas los polipéptidos del proteasoma (Figura 5.14).

Sólo alrededor del 10% de los péptidos producidos por los proteaosomas presenta la longitud óptima (8-10 aminoácidos) para encajar en la hendidura de las moléculas de clase I del CMH; es probable que cerca del 70% de los péptidos sean demasiado pequeños para funcionar en la presentación del antígeno, y el 20% remanente sobresaldría de la hendidura (que al parecer sucede en algunos casos) o requeriría una escisión adicional. Este procesamiento adicional puede suceder antes del transporte al interior del RE como, por ejemplo, por las aminopeptidasas citosólicas, o después del transporte, en cuyo caso pueden emplearse las aminopeptidasas residentes en el retículo endoplasmático (*endoplasmic reticulum resident aminopeptidases;* ERAP-1 y ERAP-2). La citocina IFNγ aumenta la producción de tres subunidades proteosómicas catalíticas especializadas β_1i, β_2i y β_5i, que sustituyen las subunidades catalíticas homólogas en el proteasoma constitutivo de las células periféricas (*housekeeping proteasome*) para el mantenimiento interno, para producir lo que se ha denominado **inmunoproteasoma**, proceso que modifica la especificidad de la escisión con el objeto de adaptar la producción del péptido a la unión con las moléculas de clase I.

Los péptidos originados tanto en el proteasoma como en el inmunoproteasoma son translocados al interior del RE por dos miembros de la familia de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*; dominios de unión a ATP), los transportadores asociados con el procesamiento del antígeno (TAP1 y TAP2) (Figura 5.15). Se ha propuesto que TAP1 y TAP2 se unen al ATP y al ADP, respectivamente, y que antes del ingreso del péptido en la cavidad de unión al péptido la única abertura de la superficie citosólica es el poro TAP. Tras el ingreso del péptido, se cierran los dominios de unión al nucleótido citosólico y el extremo luminal se abre para permitir que el péptido acceda al RE.

La cadena pesada de clase I recién sintetizada es retenida en el RE por la chaperona molecular calnexina, que se une al glucano ligado al *N*- monoglucosilado de la cadena pesada naciente. La calnexina colabora en el plegamiento de la proteína y favorece el ensamble con la β_2-microglobulina. Más tarde, la calnexina es remplazada por la calreticulina, que tiene propiedades similares a la lectina y, junto con TAP1/2, tapasina y ERp57 (tiol oxidorreductasa del RE de 57kDa), constituye el complejo de carga de péptidos PLC *(peptide loading complex)*. El puente de tapasina asegura que la molécula de clase I se asiente adyacente a los poros TAP del RE, que por lo tanto facilita la carga de péptidos. Tras la carga peptídica, la molécula de clase I se disocia del PLC, y el ahora complejo estable péptido-cadena pesada clase I-β_2- microglobulina atraviesa las cisternas apiladas del aparato de Golgi y alcanza la superficie, donde se convierte en un objetivo estático para la célula T citotóxica.

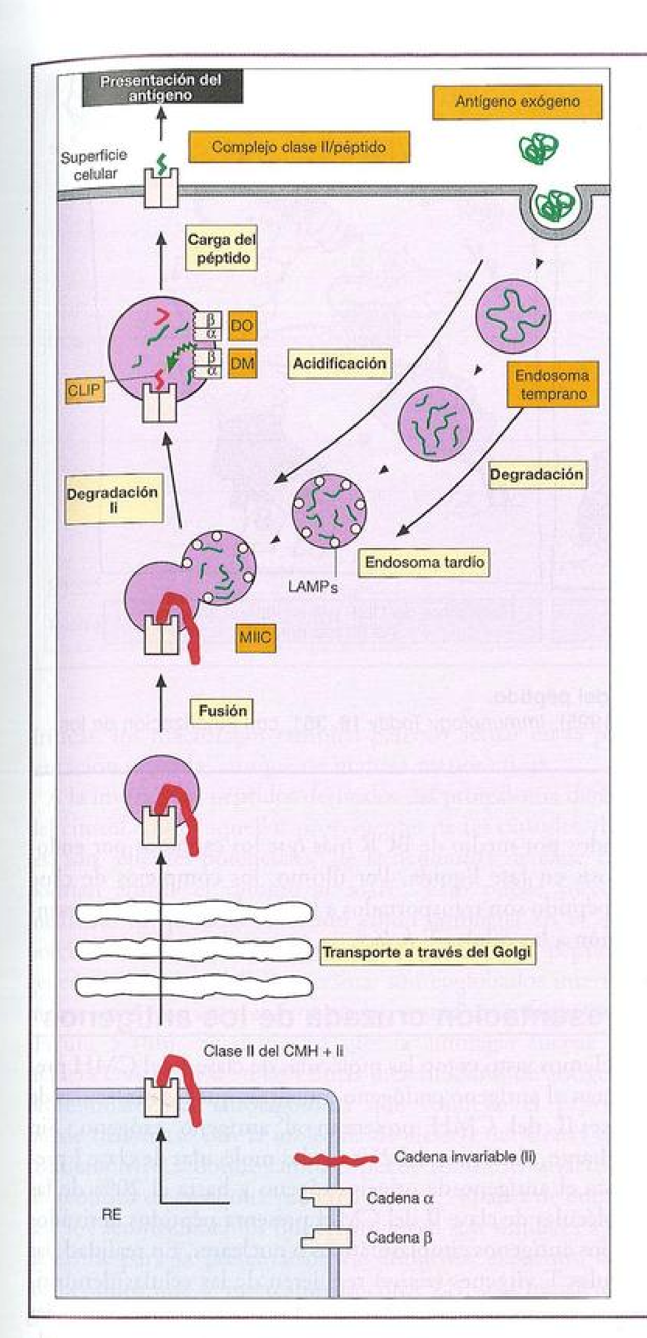


Figura 5.16. Procesamiento y presentación del antígeno exógeno por las moléculas clase II del CMH.

Las moléculas de clase II con Ii son ensambladas en el retículo endoplasmático (RE) y transportadas a través del Golgi al retículo trans-Golgi (en realidad, como un nonámero formado por tres cadenas invariables, tres α y tres β que no se muestran). Allí, la vacuola que contienen la clase II se fusiona con un endosoma tardío que tiene características lisosómicas y contienen péptidos generados por la degradación parcial de proteínas provenientes de la captación endocítica del antígeno exógeno. La fusión genera un compartimento enriquecido de clase II del CMH, éste es secretado en una vesícula endosómica tardía con las características lisosómicas conocidas como MIIC (MHC *class II-enriched compartment*, compartimiento enriquecido de clase II del CMH). Particularmente implicadas en el procesamiento de antígeno exógeno en los endosomas son las cisteinproteínas catepsina S y L, ambas con actividad de endopeptidasa, como la catepsina D y la asparagina endopeptidasa (AEP) que podrían también participar en este proceso. Con posterioridad, se consideran que las exopeptidasas catepsina B y X recortan el extremo C-terminal, y las catepsinas C y H actúan en el extremo N-terminal de los péptidos, sea antes o después de su unión en la hendidura de la clase II del CMH. La degradación de la cadena invariable elimina el CLIP (*class II-associated invariant chain peptide*; péptido de la cadena invariable asociada a la clase II) que yace en la hendidura pero, bajo la influencia de la molécula DM, éste es reemplazado por los péptidos derivados del antígeno exógeno, y los complejos son transportados a la superficie celular para su presentación a las células T *helper*. Esta versión de acontecimientos es sustentada por el hallazgo de altas concentraciones de cadena invariable de CLIP asociado con moléculas de clase II en las vacuolas MIIC de los ratones mutantes carentes de DM, que muestran una deficiencia de la presentación del antígeno a las células T.

El procesamiento del antígeno extracelular para la presentación por la molécula de clase II del CMH sigue una vía diferente

Los complejos que se forman entre las moléculas de clase II del CMH y el péptido antigénico son generados por un mecanismo intracelular muy diferente, ya que las células presentadoras del antígeno que interactúan con las células T *helper* necesitan descubrir el antígeno a partir del compartimiento *extra*celular. En esencia, una vesícula de la región *trans* del aparato de Golgi que contiene moléculas de clase II debe cruzarse con un endosoma tardío que contenga el antígeno proteico exógeno captado en el interior de la célula por un mecanismo de endocitosis.

Respecto de las moléculas de clase II en sí, son ensambladas a partir de una cadena α y una β en el retículo endoplasmático en asociación con la **cadena invariable** (Ii) transmembrana (Figura 5.16), que forma un trímero para reclutar tres moléculas de clase II en un complejo nonamérico. Ii tiene varias funciones. En primer lugar, actúa como una chaperona dedicada para asegurar el plegamiento correcto de la molécula clase II naciente. En segundo lugar, una secuencia interna de la porción luminal de Ii asienta en la hendidura del CMH para inhibir la unión precoz de péptidos en el RE antes de que la molécula clase II llegue al compartimiento endocítico que contiene el antígeno. Además, la combinación de Ii con el heterodímero αβ de clase II inactiva una señal de retención y permite el transporte al Golgi. Por último, los motivos en la región citoplasmática N-terminal de Ii aseguran la provisión de vesículas que contienen clase II para la vía endocítica.

Entretanto, la proteína exógena es captada por endocitosis. La enzima GILT (tiol reductasa lisosómica inducida por

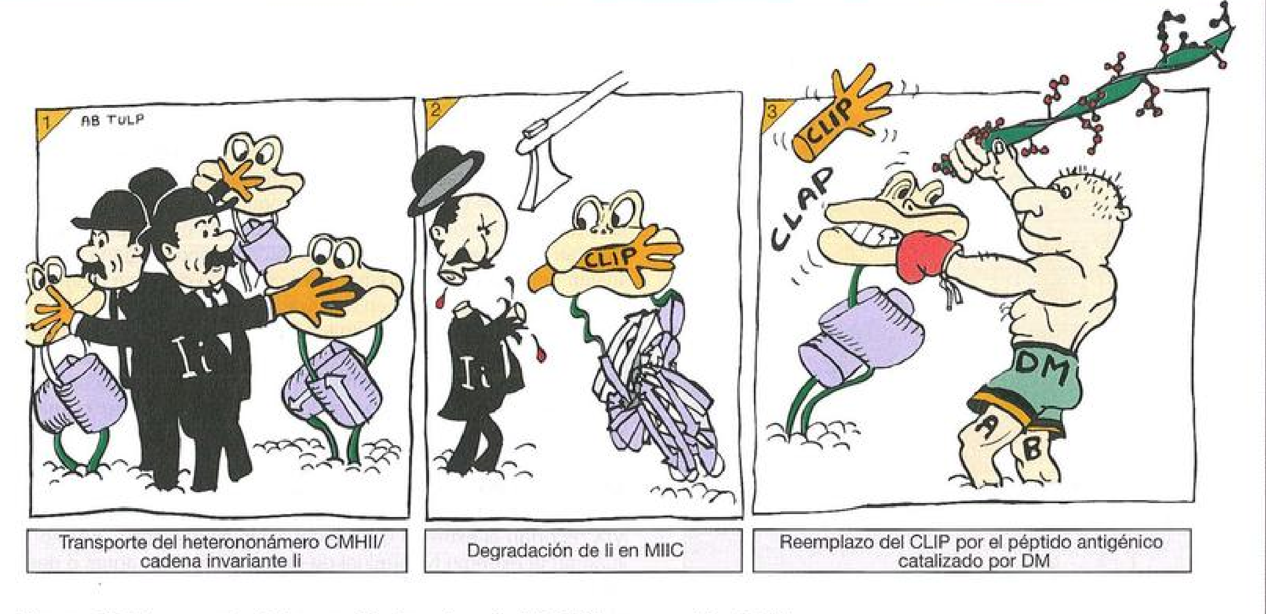


Figura 5.17. Transporte de las moléculas clase II del CMH y carga del péptido.
Ilustrado por la caricatura de Tulp. (Reproducido de Benham A. y col. [1995], *Immunology Today* **16**, 361, con autorización de los autores y Elsevier Science, Ltd.)

el interferón γ) está presente en los endosomas y romperá todos los enlaces disulfuro que se encuentren en las proteínas endocitadas. Como el endosoma temprano sufre acidificación progresiva, las proteínas son procesadas en péptidos por varias enzimas proteolíticas (véase el epígrafe de la Figura 5.16). Los endosomas tardíos adquieren de manera característica proteínas de membrana asociadas con los lisosomas (LAMP, l*ysosomal-associated* m*embrane* p*roteins*), que intervienen en la localización enzimática, la autofagia (véase más adelante) y la biogénesis lisosómica. Estos endosomas tardíos se fusionan con la vacuola que contiene el complejo clase II-Ii. En el medio ácido existente dentro de esos compartimientos enriquecidos con la clase II del CMH (MIIC, del inglés M*HC class* II*-enriched compartments*), la AEP y las catepsinas S y L degradan Ii excepto en la parte que asienta en la hendidura del CMH que, de momento, permanece como un péptido denominado CLIP (del inglés *class II-associated invariant chain peptide*, péptido de cadena invariable asociado con la clase II). Entonces, una molécula dimérica relacionada con el CMH, DM, cataliza la eliminación de CLIP y mantiene la hendidura abierta para que los péptidos generados en el endosoma pueden insertarse (Figura 5.17). La unión peptídica inicial está determinada por la concentración del péptido y su velocidad de unión, pero DM puede contribuir con posterioridad a la eliminación de los péptidos de menor afinidad para permitir su remplazo por los péptidos de alta afinidad, es decir, actúa como un péptido editor que permite la incorporación de péptidos con características de unión más estables, o sea, los que tienen una velocidad lenta de separación. En las células B en particular, una molécula relacionada con el CMH adicional, DO, se asocia con la DM unida a la clase II y modifica su función de un modo dependiente del pH. Su efecto puede ser el de favorecer la presentación de los antígenos internalizados por medio de BCR más que los captados por endocitosis en fase líquida. Por último, los complejos de clase II-péptido son transportados a la membrana para su presentación a las células T *helper*.

Presentación cruzada de los antígenos

Hemos visto cómo las moléculas de clase I del CMH presentan al antígeno endógeno, mientras que las moléculas de clase II del CMH presentan al antígeno exógeno. Sin embargo, alrededor del 25% de las moléculas de clase I presenta el antígeno de origen exógeno y hasta el 20% de las moléculas de clase II del CMH presenta péptidos derivados de los antígenos citoplasmáticos o nucleares. En realidad, las células T vírgenes (*naive*) requieren de las células dendríticas, pero la mayoría de los virus no tienen tropismo por las células dendríticas y, por consiguiente, no están presentes de manera natural en el citosol de las CPA profesionales. Dados los dos mecanismos separados (endógenos/clase I, exógenos/clase II) indicados en las secciones anteriores, ¿cómo puede lograrse esto? La respuesta a este acertijo se basa en el fenómeno de "presentación cruzada". Los antígenos fagocitados o endocitados pueden salir furtivamente de la vacuola en la que han sido englobados y ganar acceso al citosol (Figura 5.18a). La vía de escape puede involucrar el canal multimolecular Sec61. Una vez que ingresan en el citosol, están bastante dispuestos para la ubicuitinación y la degradación ulterior por el proteasoma, seguido por la transferencia mediada por TAP hacia el interior del RE y la presentación por las moléculas de clase I del CMH. También es posible que algunos antígenos endocitados puedan ser cargados directamente en las moléculas de clase I del CMH recicladas dentro del endosoma sin necesidad de ser procesados primero en el citosol. Además de las células den-

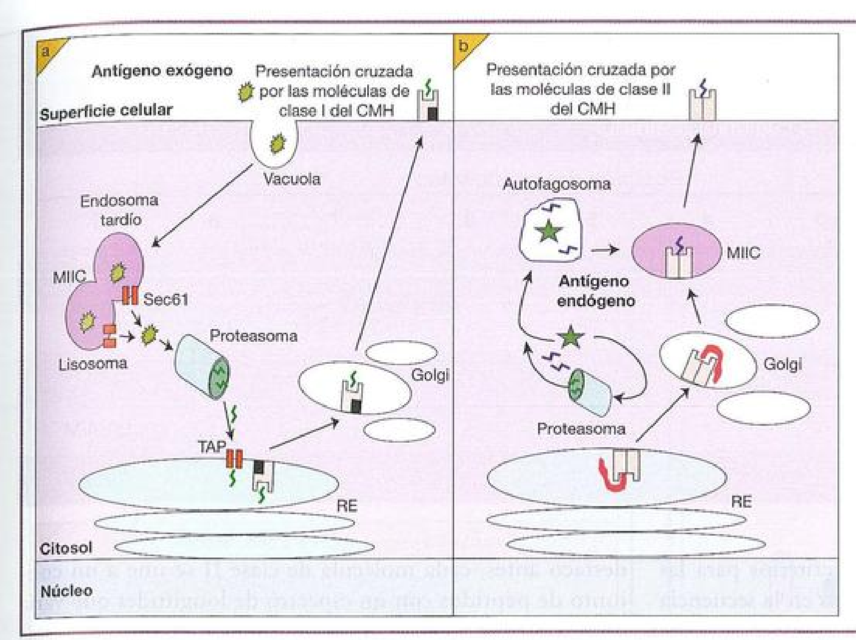


Figura 5.18. Presentación cruzada del antígeno.

a) Los antígenos exógenos endocitados pueden tener acceso a la vía de procesamiento de clase I cuando ingresan citosol desde los compartimientos de las moléculas clase II del CMH (MIIC), quizá a través de los canales Sec61. Otras vías para la presentación de péptidos provenientes de antígenos exógenos en las moléculas de clase I del CMH pueden incluir el intercambio peptídico con las moléculas clase I del CMH recicladas a partir de la membrana celular. b) La presentación cruzada también puede actuar "al revés" con los péptidos generados a partir del proteasoma (y también antígenos endógenos intactos) que sufren autofagia para ingresar a la vía de procesamiento y presentación por las moléculas de clase II. RE, retículo endoplasmático.

dríticas, los macrófagos también parecen actuar en la presentación cruzada, aunque de manera menos eficaz.

A la inversa, los péptidos derivados del proteasoma dentro del citosol, como aquellos provenientes de las cápsides virales, son "clientes potenciales" de la hendidura de clase II y podrían abrirle el camino al MIIC. Esto puede suceder mediante un proceso conocido como autofagia en el que porciones del citoplasma, que tal vez contengan péptidos generados a partir del proteasoma, son englobados internamente por estructuras conocidas como autofagosomas (Figura 5.18b). Se demostró que la autofagia sucede de manera constitutiva en las células presentadoras de antígeno profesionales. El autofagosoma que contiene el péptido puede fusionarse con la molécula de clase II del CMH que contiene MIIC, donde también puede realizarse la escisión proteolítica de cualquier proteína intacta. A partir de entonces, los acontecimientos que se producen son similares a los descritos para la presentación de antígenos exógenos, con los péptidos que se intercambian con CLIP, y la transferencia del péptido-CMH hacia la superficie celular. Durante los períodos de estrés celular, puede emplearse un segundo mecanismo, la autofagia mediada por chaperona, en la que participan miembros de la familia de proteínas del choque térmico 70, que se une a la proteína a ser procesada. El complejo proteico es luego reconocido por la proteína de membrana asociada al lisosoma 2a (LAMP-2a) y arrastrado al interior de la luz del lisosoma para su procesamiento ulterior.

Naturaleza del péptido de la "hendidura"

Las hendiduras del CMH imponen algunas restricciones bien definidas en cuanto a la naturaleza y la longitud de los péptidos que pueden alojar, y el patrón varía con los diferentes alelos del CMH. No obstante, en la mayoría de las posiciones del ligando peptídico se permite un sorprendente grado de redundancia y esto se relaciona en parte con los residuos que interactúan con el receptor de las células T más que con el CMH.

Unión a moléculas de clase I del CMH

El análisis con rayos X revela que los péptidos quedan montados de manera estrecha a lo largo de la hendidura en una configuración extendida, sin espacio libre para las estructuras α-helicoidales (Figura 5.19). Las fuerzas involucradas en la unión del péptido al CMH y en la unión del TCR al péptido-CMH son similares a las observados entre el anticuerpo y el antígeno, es decir, no covalente. El extremo N-terminal del péptido unido está estrechamente enlazado por hidrógeno, independientemente del alelo del CMH, a residuos conservados en un extremo de la hendidura, mientras que el C-terminal se involucra en la formación de enlaces de hidrógeno e interacciones iónicas en el otro extremo de la hendidura.

Los péptidos que se encuentran naturalmente pueden ser extraídos de las moléculas purificadas de clase I del CMH y ser sujetos a análisis para establecer sus secuencias. De manera predominante, tienen entre 8 y 10 residuos de longitud; los péptidos más largos sobresalen de la hendidura. El análisis de las secuencias de las agrupaciones peptídicas indica aminoácidos con características definidas en ciertas posiciones importantes (Cuadro 5.1). Éstas se denominan **posiciones de anclaje** y representan las cadenas laterales del aminoácido requerido que se adaptan a los bolsillos específicos para el alelo en la hendidura del CMH (Figura 5.20a). Por lo general, hay dos (y a veces tres) posiciones de anclajes principales para los péptidos de unión de clase I, uno en el extremo C-terminal y el otro, con frecuencia, en la posición 2 (P2), pero también puede hallarse en otras posiciones. Por ejemplo, el prevalente HLA-A*0201 presenta bolsillos para leucina, metionina o isoleucina en la posición P2 del péptido y para leucina, valina, isoleucina o metionina en P9. A veces, un bolsillo de anclaje principal puede ser remplazado por dos o tres bolsillos secundarios de unión más débiles. Incluso con la desventaja de tener dos o tres motivos de anclaje, cada alelo de clase I del CMH puede alojar un número considerable de péptidos diferentes. Por lo

Cuadro 5-1. Los ligandos peptídicos naturales para la clase I del CMH contienen dos residuos de anclaje específicos del alelo. (Basado en Rammensee H.G., Friede T. and Stevanovic S. (1995) *Immunogenetics* 41, 178.) Las letras representan el código de Dayhoff para los aminoácidos; donde más de un residuo predomina en una posición dada, se dan alternativas; * = cualquier residuo.

	Posición del aminoácido								
Alelo clase I	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
H-2K^{d}	*	Y	*	*	*	*	*	*	I/L
H-2K^{b}	*	*	*	*	Y/F	*	*	L/M	
H-2D^{b}	*	*	*	*	N	*	*	*	L/M/I
HLA-A*0201	*	L/M/I	*	*	*	*	*	*	L/V/I/M
HLA-B*2705	*	R	*	*	*	*	*	*	R/K/L/F

tanto, siempre y cuando se cumplan los criterios para las posiciones de anclaje, los otros aminoácidos en la secuencia pueden variar.

Salvo en el caso de la infección viral, los ligandos naturales de clase I serán péptidos propios derivados de las proteínas sintetizadas de manera endógena por la célula, histonas, proteínas de choque térmico, enzimas, secuencias señal líderes y así sucesivamente. Alrededor del 75% de estos péptidos se origina en el citosol y en su mayoría son poco abundantes, entre 100 y 400 copias por célula. Así, las proteínas expresadas con una abundancia poco habitual, como las proteínas oncofetales en los tumores y los antígenos virales en las células infectadas, deberían de ser detectadas con facilidad por las células T en reposo.

Unión a moléculas de clase II del CMH

A diferencia de lo que sucede con la clase I, donde la formación de enlaces de hidrógeno independiente del alelo al péptido se centra en los extremos N y C terminales, los residuos de la clase II de la hendidura se unen al hidrógeno a lo largo de toda la longitud del péptido con enlaces a los átomos que forman la cadena principal. Respecto de los bolsillos de unión específicos del alelo de clase II para la cadena lateral del péptido, los motivos basados en los tres o cuatro residuos de anclaje principales parecen estar a la orden del día (Figura 5.20b). Los bolsillos de unión secundarios, con menos preferencia estricta por cadenas laterales individuales, pueden aún modificar la afinidad del complejo péptido-CMH, mientras que la "ausencia de bolsillos" también puede influir en las preferencias para secuencias particulares de péptidos, en especial si los obstáculos estéricos se convierten en un factor. Lamentablemente, no podemos establecer estas preferencias para los residuos individuales dentro de un péptido dado. Esto se debe a que, si bien la longitud de la hendidura de clase II es similar a la de clase I, la naturaleza abierta de la hendidura no restringe la longitud del ligando. Por consiguiente, el péptido puede colgar de manera indiferente de cada extremo de la hendidura, bastante distinto del "chaleco de fuerza" que representa el sitio del ligando de la clase I (Figuras 5.19 y 5.20). En consecuencia, como se destacó antes, cada molécula de clase II se une a un conjunto de péptidos con un espectro de longitudes que varía de 8 a 30 residuos de aminoácidos, y el análisis de estas agrupaciones que se encuentran de manera natural aisladas del CMH no establecería cuáles son las cadenas naturales de aminoácidos que se unen de modo preferente a los nueve sitios disponibles dentro de la hendidura. Un enfoque moderno es estudiar la unión de las moléculas de clase II solubles a enormes colecciones de péptidos con secuencias al azar expresadas en la superficie de bacteriófagos (véase colecciones combinatorias de fagos, p. 146). La idea que está surgiendo es que cada aminoácido en un péptido contribuye de manera independiente de los otros a la fuerza de unión total, y debería de ser posible computar cada contribución cuantitativa de estos datos de unión al azar, de modo tal que por último podríamos predecir qué secuencia en un antígeno proteico dado se uniría a cierto alelo de clase II.

Debido a la accesibilidad de la hendidura, a medida que la molécula nativa se despliega y se reduce, pero antes de que suceda degradación alguna, los epítopos de alta afinidad podrían ser incluidos inmediatamente en la hendidura de unión a la clase II, donde están protegidos de la proteólisis. Al menos para la molécula HLA-DR1, se demostró que el péptido de unión conduce a una transición desde una conformación más abierta a una más compacta que se extiende a lo largo de la hendidura de unión al péptido. Después de que el péptido se ha unido al CMH, se lleva a cabo el recorte de los extremos N-terminal y C-terminal del péptido. Varios factores influirán en la concentración relativa del complejo péptido-CMH formado: la afinidad por la hendidura determinada por el ajuste de anclajes, la facilitación o la obstaculización por residuos internos (las secuencias externas de los residuos de unión tienen poco o ningún efecto en la especificidad de unión al péptido), la sensibilidad a las proteasas y la reducción de los disulfuros, y la competencia con determinantes de mayor afinidad.

Como resultado de la diversidad de concentraciones de diferentes complejos peptídicos, surgirá una jerarquía de epítopos según su capacidad de interactuar con las células T; el epítopo más eficaz será el **dominante** y el menos

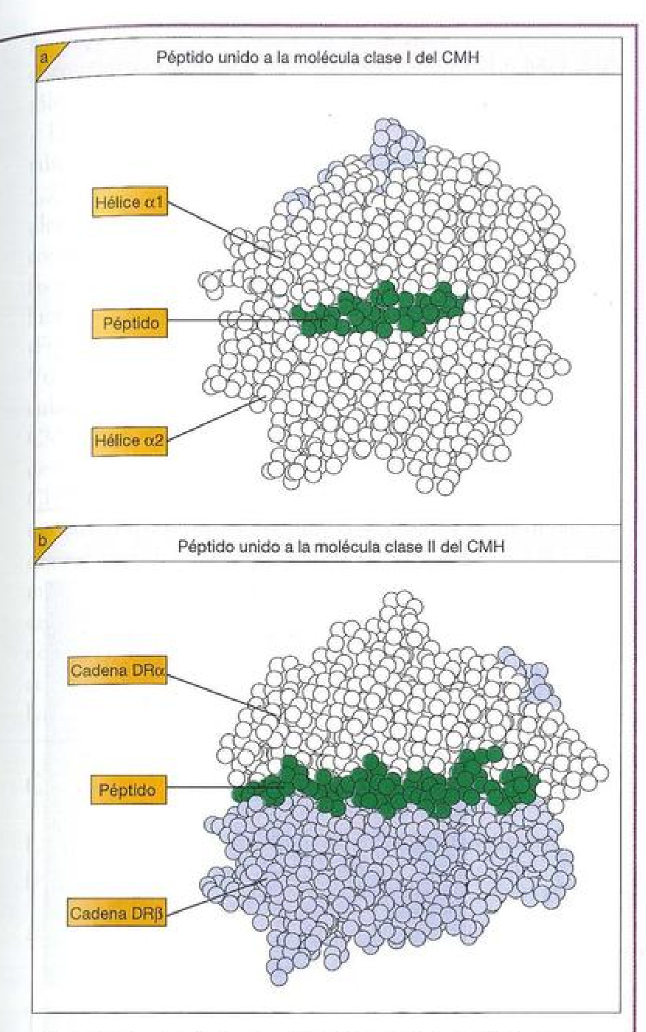


Figura 5.19. Unión de los péptidos a la hendidura del CMH.

"Vista" desde el receptor de la célula T, que permite apreciar de frente las hélices α que cubren la hendidura (véase la Figura 4.17b) representada en modelos de esferas sólidas. a) Péptido 309-317 de la transcriptasa inversa del HIV-1 unido firmemente dentro de la hendidura de la clase I del HLA-A2. En general, una a cuatro de las cadenas laterales del péptido apuntan hacia el TCR, lo cual da una accesibilidad al solvente del 17-27 %. b) Hemaglutinina 306-318 del virus influenza que yace en la hendidura de clase II del HLA-DR1. Al contrario de lo que sucede con la clase I, el péptido se extiende por fuera de ambos extremos de la hendidura de unión y de un promedio de 13 cadenas laterales 4 a 6 se orientan hacia el TCR, lo cual incrementa la accesibilidad al solvente a un 35%. (Basado en Vignali D.A.A y Strominger J.L. [1994], *The Immunologist* **2**, 112, con autorización de los autores y editores.)

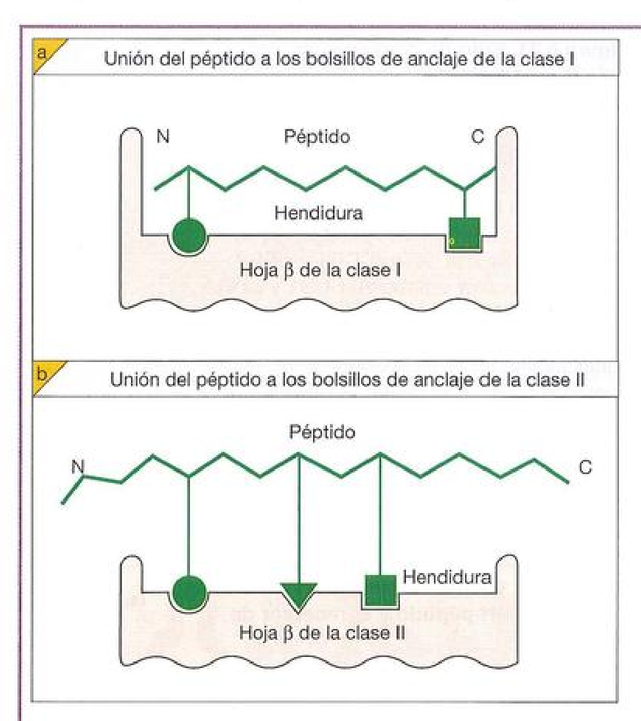


Figura 5.20. Los bolsillos específicos de los alelos en las hendiduras de unión al CMH se unen a los motivos de los principales residuos de anclaje de los ligandos peptídicos.

Corte a través del eje longitudinal de la hendidura del CMH. Las dos hélices α que forman las paredes laterales de la hendidura se sitúan por encima y por debajo del plano del papel. a) La hendidura de la molécula de clase I está cerrada en ambos extremos. El anclaje del carboxilo terminal es invariable, pero el segundo anclaje en P2 también puede estar en en otras posiciones de acuerdo con el alelo del CMH (véase el Cuadro 5.1). b) Por el contrario, la hendidura de la molécula de clase II está abierta en los extremos y no restringe la longitud del péptido. En general hay tres o cuatro bolsillos de anclaje con, por ejemplo, P1 dominante para HLA-DR1 y P4 dominante para HLA-DR3.

eficaz, el **subdominante**. Los epítopos **propios** dominantes, y tal vez los subdominantes, inducirán generalmente tolerancia durante la ontogenia de células T en el timo (véase p. 288). Los complejos con algunos péptidos propios que son de relativa poca abundancia no tolerarán sus equivalentes de células T, y estas células T autorreactivas plantean una constante amenaza subyacente de autoinmunidad. Éstos son epítopos **crípticos,** y en el Capítulo 18 se analizará su posible relación con la enfermedad autoinmunitaria.

El receptor de la célula T αβ forma un complejo ternario con el CMH y el péptido antigénico

Cuando se inmovilizan preparados de TCR soluble obtenidos mediante tecnología de DNA recombinante en un elemento sensor (chip), esos TCR pueden unirse específicamente al complejo CMH-péptido con afinidades bastante bajas (K_a), en el orden de 10^4 a 10^7 M^{-1}. Esta baja afinidad y el número relativamente pequeño de contactos atómicos entre los TCR y sus ligandos CMH-péptido cuando las células T se ponen en relación con su célula diana hacen que el aporte del reconocimiento de los TCR a la energía de unión de esa interacción celular sea bastante leve. La mayor parte de la atracción reside en los principales pares de moléculas de adhesión independientes del antígeno, como ICAM-1/2, LFA-1/2 y CD2 y CD2-LFA3 que son reclutados en la sinapsis inmunitaria (Figura 8.12), pero cualquier activación posterior de la célula T por el CMH-péptido antigénico debe incluir la señalización a través del receptor de la célula T.

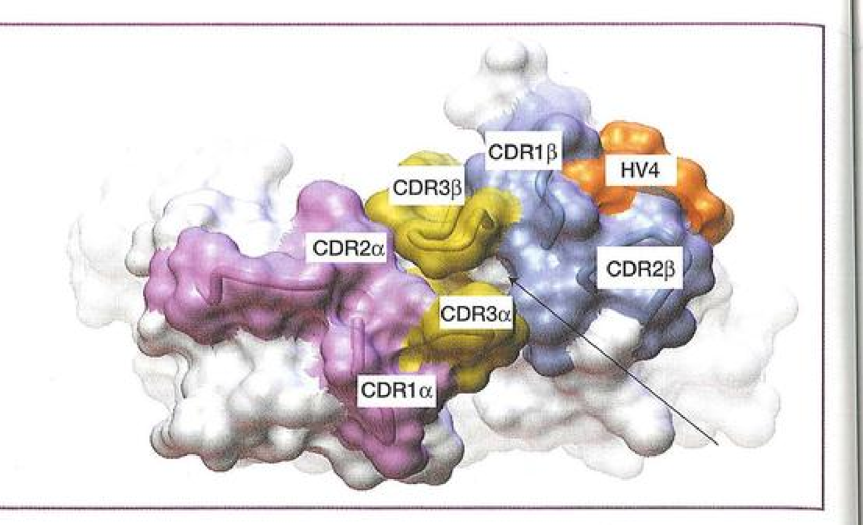


Figura 5.21. Sitio de combinación del antígeno con el receptor de la célula T.

Si bien la superficie es relativamente plana, existe un surco bien visible entre CDR3α y CDR3β que puede alojar una cadena lateral del péptido unido a la hendidura de una molécula del CMH, con su parte central orientada hacia arriba. Los vestigios de la superficie y del asa de Vα CDR1 y CDR2 aparecen en color violeta, Vβ CDR1 y CDR2 en azul, Vα CDR3 y Vβ CDR3 en amarillo y la cuarta región hipervariable Vβ, que toma contacto con algunos superantígenos, en anaranjado. (Reproducido de Garcia K.C. y col. [1996], *Science* **274**, 209, con autorización.)

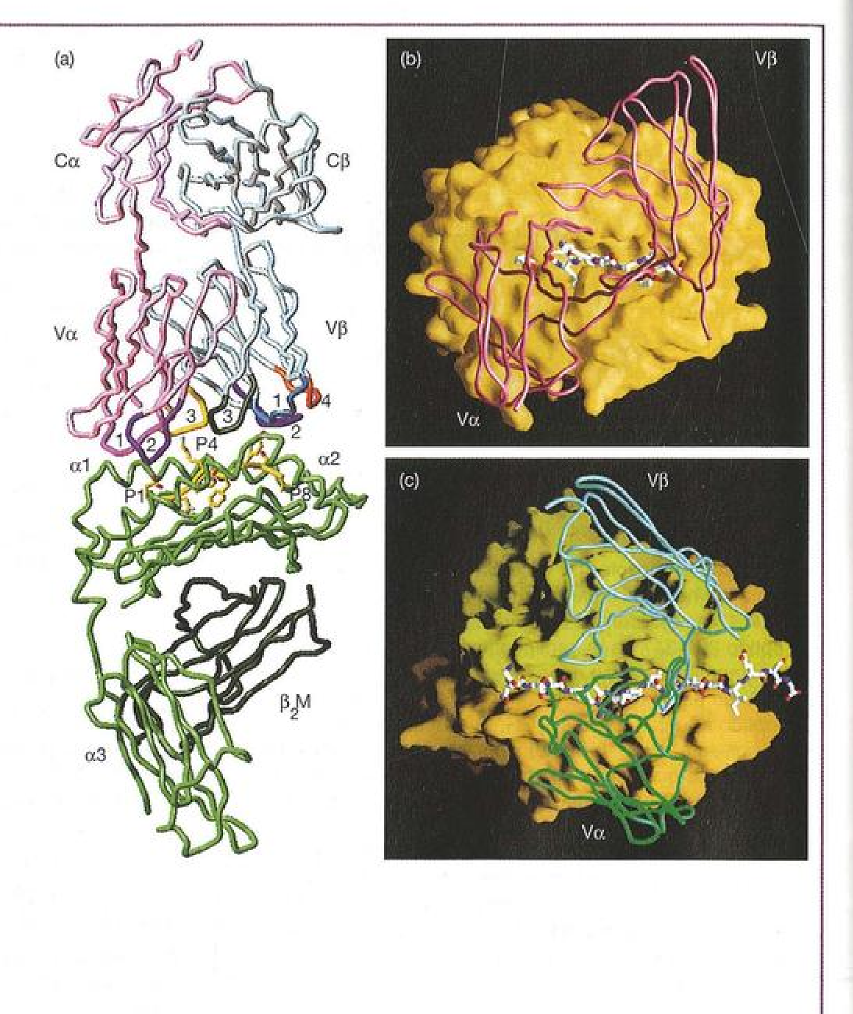


Figura 5.22. Complementariedad entre el complejo CMH-péptido y el receptor de célula T.

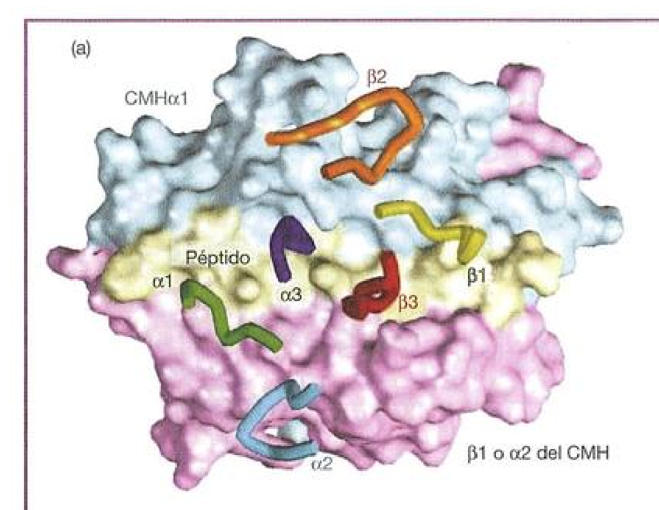
a) Estructura del esqueleto de un receptor de célula T (TCR) que reconoce un péptido presentado por la molécula H-2K^b de clase I del CMH. El TCR se muestra en la mitad superior de la figura, con la cadena β de color rosado y su CDRI de color magenta, el CDR2 en violeta y el CDR3 en amarillo. La cadena α está coloreada de azul claro con su CDR1 celeste, CDR2 azul marino, CDR3 verde y la cuarta asa hipervariable en anaranjado. Debajo del TCR se encuentra la cadena α del CMH en verde y la β_2- microglobulina en verde oscuro. El péptido con sus cadenas laterales en posiciones P1, P4 y P8 está coloreado de amarillo. (Reproducido de Garcia K.C. y cols. [1998], *Science* **279**, 1166-1172, con autorización.) b) El mismo complejo mirando hacia la representación de la superficie molecular del H-2K^b en amarillo, con el modo de acoplamiento diagonal del TCR en forma de estructura de alambre (rosado). El péptido dEV8 está dibujado con forma de esferas y barras. c) Por el contrario, aquí vemos el modo de acoplamiento octogonal de un TCR que reconoce un péptido presentado por la molécula de clase II del CMH. La representación serpenteante de la estructura del TCR (scD10) muestra el Vα en verde claro y el Vβ en azul, y la representación de la superficie molecular de I-A^k de la clase II posee una cadena α en verde claro y la cadena β en anaranjado, que sostienen su péptido derivado de la conalbúmina. (Reproducido de Reinherz E.L. y cols. [1999], *Science* **286**, 1913, con autorización.)

Topología del complejo ternario

De las tres regiones determinantes de la complementariedad presentes en cada cadena de TCR, CDR1 y CDR2, son mucho menos variables que CDR3, la que, como su equivalente inmunoglobulina, tiene secuencias (D)J que son el resultado de una multiplicidad de mecanismos de combinación y de inserción de nucleótidos. Como los elementos del CMH en un individuo dado son fijos pero es previsible una gran variabilidad en el péptido antigénico, un modelo razonable sería que CDR1 y CDR2 de cada cadena de TCR se ponga en contacto con las hélices α del CMH, y el CDR3 esté vinculado con la unión al péptido. De acuerdo con este punto de vista, diversos estudios demostraron que las célu-

las T que reconocen variaciones pequeñas en un péptido, en el contexto de un elemento de restricción del CMH dado, sólo difieren en sus regiones hipervariables del CDR3.

Los sitios de combinación de los TCR que han sido cristalizadas hasta la fecha son relativamente planos (Figura 5.21), lo cual es de esperar dada la necesidad para la complementariedad a la superficie levemente ondulada de la combinación péptido-CMH (Figura 5.22a). En casi todas las estructuras hasta ahora resueltas, el reconocimiento involucra al TCR, que asienta en forma diagonal u ortogonal (Figura 5.22b,c) a través del péptido-CMH con el dominio Vα CDR1 y CDR2 del TCR sobre la hélice α_2 de las moléculas de clase I o la hélice α_1 de las moléculas de clase II del CMH y el dominio Vβ CDR1 y CDR2 sobre la hélice β_1 de clase I o clase II del CMH (Figura 5.23). Las regiones CDR3 más variables toman contacto con el péptido, en particular en los residuos medios (P4 a P6). Hay pruebas para sugerir que el TCR se une al comienzo con el CMH de un modo bastante independiente del péptido, y a ello le siguen cambios conformacionales importantes en las asas CDR3 del TCR para permitir contactos óptimos con el péptido. La activación a través del TCR puede operar si estos ajustes hacen la unión más estable y multimérica.



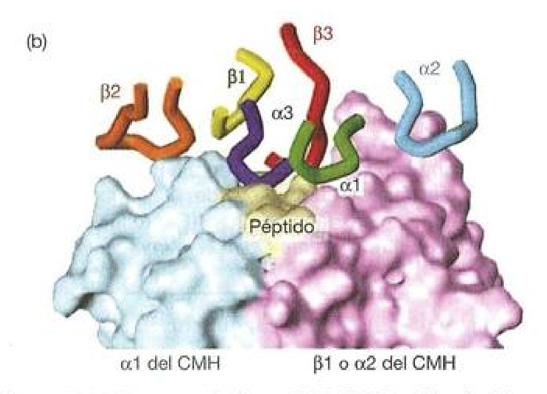


Figura 5.23. Reconocimiento TCR CDR3 del péptido presentado por el CMH.

a) Contactos entre las asas CDR1-3 de las cadenas α y β de un receptor de célula T (TCR) y una superficie de esferas sólidas de CMH y péptido. El ejemplo mostrado aquí es un TCR de ratón unido al H2 I-A^b que presenta un péptido 13-mer. La región α1 del CMH está coloreado de celeste, la región β1 o α2 del CMH de magenta y el péptido de amarillo. Se indican las asas CDR de las cadenas α y β del TCR (α1 es el CDR1 de la cadena α y así sucesivamente). b) Perspectiva en elevación de las interacciones. (Reproducido de Marrack P. y cols. [2008], *Annual Review of Immunology* **26**, 171-203, con autorización.)

Células T con una perspectiva diferente

Las moléculas de clase I no clásicas también pueden presentar al antígeno

Moléculas similares a las de la clase I del CMH

Además de las moléculas de clase I clásicas del CMH sumamente polimorfas (HLA-A, HLA-B y HLA-C en los seres humanos, y H-2K, H-2D y H-2L en el ratón), existen otros locus que codifican moléculas del CMH que contienen β_2-microglobulina con cadenas pesadas relativamente no polimorfas. Éstas son **H-2M**, **H-2Q** y **H-2T** en los ratones, y **HLA-E**, **HLA-F** y **HLA-G** en el *Homo sapiens.*

La molécula **H-2M3** codificada por el locus H-2M es inusual, ya que su hendidura de unión al péptido tiene muchos aminoácidos no polares destinados a facilitar la unión del residuo *N*-formil metionina hidrófobo de los péptidos provenientes de las proteínas bacterianas, que entonces puede ser presentado a las células T. La expresión de H-2M3 está limitada por la disponibilidad de esos péptidos, de modo que sólo se observan niveles altos durante las infecciones por procariontes. La demostración de células T $\alpha\beta$ CD8+ restringidas por H-2M3 específicas para *Listeria monocytogenes* sustenta el concepto de que esta molécula de clase I podría suscribir una función fisiológica en la infección. El papel de la expresión de HLA-G en el citotrofoblasto extravellositario se tratará en el Capítulo 16.

La familia CD1 de moléculas similares a las de la clase I que no pertenecen al CMH puede presentar antígenos lipídicos

Después de las moléculas de clase I y clase II del CMH, la familia CD1 representa un tercer linaje de moléculas presentadoras de antígeno reconocidas por los linfocitos T. La cadena polipeptídica CD1 se asocia con la β_2-microglobulina como lo hace la cadena pesada de clase I del CMH, y la estructura global es similar a la de las moléculas de clase I clásicas, aunque la topología de la hendidura de unión está alterada (véase la Figura 4.27).

Las moléculas **CD1** pueden presentar un espectro extenso de antígenos **lipídicos, glucolipídicos** y **lipopeptídicos** e incluso ciertas moléculas orgánicas pequeñas a los diversos clones de células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ y, en el caso de CD1d, a las células NKT (véase más adelante). Un motivo estructural común facilita la presentación del antígeno mediado por CD1 y comprende una región hidrófoba de una cadena ramificada o con dobles acilos y una porción hidrófila formada por grupos polares o cargados de lípidos con hidratos de carbono o péptidos asociados o sin ellos. Las regiones hidrófobas son incluidas en la hendidura de unión profun-

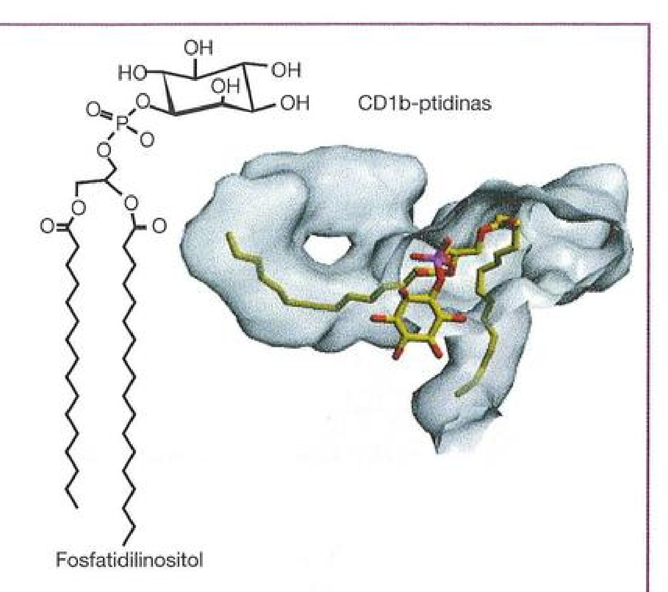


Figura 5.24. Presentación del antígeno por CD1.

En este ejemplo, la unión del fosfatidilinositol (ptidinas) a CD1b se muestra con el bolsillo de unión representado en una vista desde arriba y mirando directamente hacia la hendidura. Los esqueletos alifáticos figuran en verde, el átomo de fósforo en azul y los átomos de oxígeno en rojo. (Reproducido de Hava D.L. y col. [2005], *Currente Opinion in Immunology* **17**, 88-94).

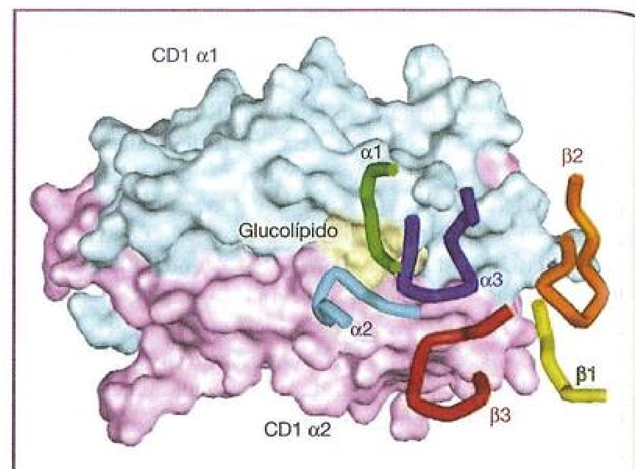
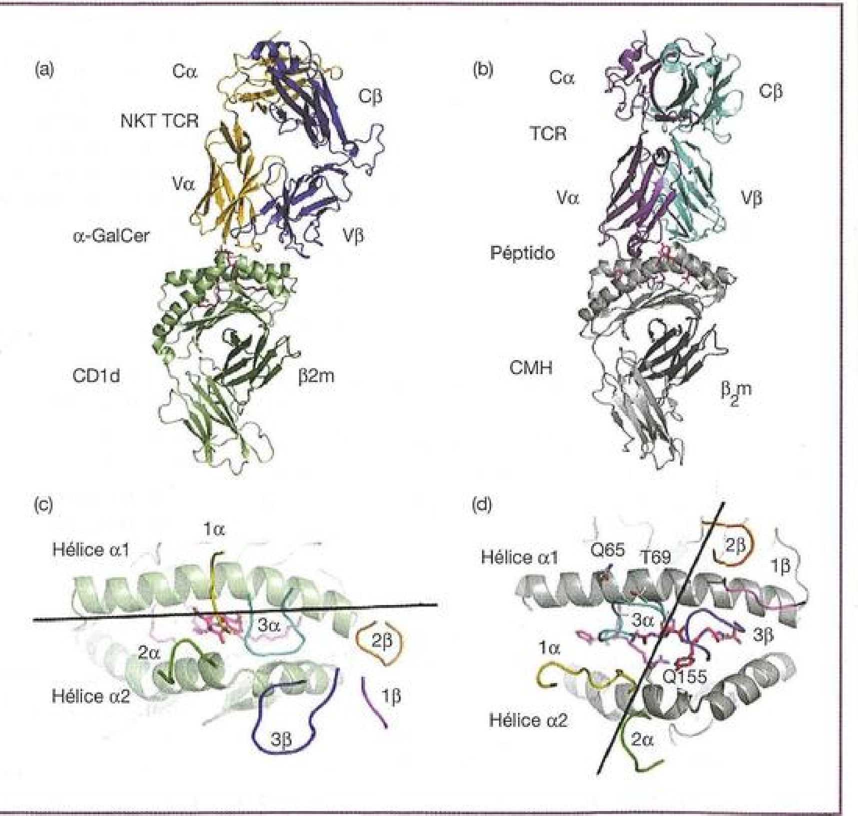


Figura 5.25. Reconocimiento por el receptor de célula T (TCR) del antígeno presentado por CD1d.

Reconocimiento por TCR αβ de una α-galactosilceramida presentada por CD1d. Se muestran las regiones α1 *(coloreada de celeste)* and α2 *(magenta)* de CD1d y el glucolípido *(amarillo),* junto con las asas CDR de las cadenas α y β del TCR. Nótese que la unión del TCR es hacia un extremo de la molécula CD1d. Dado que el componente lipídico del antígeno está oculto dentro de la molécula CD1d, el reconocimiento de la α-galactosilceramida por el TCR implica sólo la cabeza glucosilada que sobresale. La cadena α CDR1 (α1) del TCR interactúa sólo con el antígeno mientras que la cadena α CDR3 (α3) interactúa tanto con el antígeno como con el CD1d. El reconocimiento del antígeno no implica a la cadena β del TCR, cuyo CDR2 (β2) and CDR3 (β3) se une a CDld. Las cadenas α CDR2 (α2) y β CDR1 (β1) no participan en la unión al complejo CD1d-antígeno en la estructura cristalográfica.
(Reproducido de Marrack P. y cols. [2008], *Annual Review of Immunology* ***26***, 171-203, con autorización.)

Figure 5.26. Comparación del reconocimiento por los TCR de los complejos CD1d-lípido y CMH-péptido.

a) Unión de la cadena α *(amarillo)* y la cadena β *(azul)* del receptor de la célula T (TCR) a la α-galactosilceramida *(magenta)* presentado por CD1d *(verde)*. b) Unión de la cadena α *(violeta)* y la cadena β *(azul)* al CMH *(gris)* y péptido *(magenta)*.
c) Modo de acoplamiento paralelo observado en el reconocimiento por el TCR (CDR1 α, amarillo; CDR2α, verde; CDR3α, celeste; CDR1β, magenta; CDR2β, anaranjado; CDR3β, azul) de α-galactosilceramida (magenta) presentada por CD1d (α-hélices, verde claro). d) Modo de acoplamiento diagonal de un TCR típico (asas de CDR coloreadas como en [c]) con el complejo péptido-CMH. En c) y d), el centro de masa enre los dominios Vα y Vβ está indicada por la línea negra. (Reproducido de Borg N.A. y cols. [2007], *Nature* **448,** 44-49, con autorización).



da del CD1, mientras que las regiones hidrófilas, como las estructuras hidrocarbonadas, son reconocidas por el TCR (Figura 5.24). En la estructura cristalográfica, el TCR αβ reconoce CD1d más α-galactosilceramida mediante el acoplamiento en paralelo al complejo (Figura 5.25). Esto es bastante diferente de la unión diagonal u ortogonal que suele observarse con el reconocimiento TCR αβ del complejo péptido-CMH (Figura 5.26).

Los ligandos para CD1a comprenden el sulfátido esfingolípido y los mucopéptidos, como didehidroximicobactina proveniente de *Mycobacterium tuberculosis;* para CD1b, son el ácido micólico y las estructuras hidrocarbonadas como el componente lipoarabinomanano de la pared celular micobacteriana, y para CD1c se incluye manosil-1-fosfodolicol micobacteriano. Aún están en el ámbito de la investigación otros posibles ligandos microbianos para CD1d, si bien se conoce una β-galactosilceramida proveniente de esponjas marina que es un estimulador muy potente de las células NKT invariables (iNKT, véase más abajo) cuando es presentada por esta molécula. El quinto miembro de la familia, CD1e, parece estar implicada en el procesamiento de los glucolípidos antes de su presentación por otros miembros de la familia CD1. Los lípidos tanto endógenos como exógenos pueden ser presentados por CD1 y, al igual que las moléculas de clase I del CMH, la cadena pesada CD1 forma complejos con la calnexina en el retículo endoplasmático y luego es remplazado con la calreticulina. Entonces, la proteína Erp57 es reclutada en el complejo. La disociación posterior del complejo permite la unión de la β_2-microglobulina y, en un paso en la que participa la proteína de transferencia de triglicérido microsómico (MTP), la inserción de antígenos lipídicos endógenos en la región CD1 de unión con el antígeno. Lo mismo que sus "colegas" proteicos, los antígenos lipídicos y glucolipídicos exógenos son liberados al compartimiento endosómico ácido. La localización de las moléculas CD1b, CD1c y CD1d en la vía endocítica está mediada por una secuencia de la cola citoplasmática basada en tirosina y dirigida al citosol. CD1a, que no tiene este motivo, se desplaza a través de los endosomas tempranos reciclados. Tanto los seres humanos como los ratones carentes de prosaposina, una molécula precursora de las proteínas saposinas A-D activadoras de esfingolípidos (SAP), muestran deficiencias en la presentación de antígenos lipídicos a las célula T. Diversas líneas de investigación indican que estas moléculas pueden participar en la transferencia de antígenos lipídicos a CD1 en los endosomas.

Algunas células T tienen marcadores NK

Las células NKT tienen el marcador NK1.1, característico de las células NK, junto con un receptor de células T. Hay dos poblaciones, una con TCR diversos y la otra denominada como células NKT invariables (células iNKT). En esta última población el TCR posee una cadena α invariable (Vα24Jα18 en los seres humanos, Vα14Jα18 en los ratones) sin modificaciones en la región N y un repertorio extremadamente limitado de cadena β basada en Vβ11 en los seres humanos y Vβ8,2, Vβ7 y Vβ2 en el ratón. Éstas reconocen antígenos lipídicos como β-galactosilceramida e isoglobósidos presentados por CD1d y constituyen un componente fundamental del compartimiento de la célula T, ya que representan del 20 al 30% de las células T de la médula ósea y el hígado en los ratones, y hasta el 1% de las células del bazo. Tras la activación, las células NKT segregan con rapidez IL-4 e IFNγ y, por lo tanto, pueden estar implicadas en la estimulación de muchos tipos celulares que comprenden las células dendríticas, las células NK y las células B.

Los TCR γδ tienen algunas características de anticuerpos

A diferencia de las células T αβ, las células T γδ reconocen los antígenos directamente, sin que sea necesario su procesamiento. En el ratón, se aislaron células T γδ que reconocen directamente la molécula I-E_k de clase I y las moléculas no clásicas T10 y T22 del CMH. Ni los residuos polimorfos asociados con el péptido de unión a las moléculas clásicas del CMH ni el péptido en sí participan. Tras su activación, T10 y T22 son expresados en las células T αβ, y se ha sugerido que las células T γδ específicas para estas moléculas no clásicas del CMH pueden ejercer una función reguladora. El estrés y el daño celular parecen ser activadores poderosos de las células T γδ y ciertas proteínas del choque térmico (p.ej., hsp60) pueden actuar como estimuladores de estas células. Los antígenos de bajo peso molecular **no proteicos que contienen fosfato**, como el pirofosfato de isopentenilo y el fosfato de etilo, presentes en varias células microbianas y de mamíferos, también se han identificado como estimuladores poderosos.

Los datos acerca del reconocimiento directo del antígeno por las células T γδ provienen de experimentos con un clon de estas células específico para la glucoproteína-1 del virus herpes simple. Este clon podría ser estimulado por la proteína nativa fijada en material plástico, lo que sugiere que las células son activadas por el entrecruzamiento de sus receptores con el antígeno al que reconocen en el estado nativo intacto, del mismo modo que lo hacen los anticuerpos. Existen argumentos estructurales que apoyan este concepto. Las asas CDR3, fundamentales para el reconocimiento del antígeno extraño por las células T y por los anticuerpos, son comparables en longitud y relativamente limitados con respecto al tamaño en las cadenas α y β del TCR αβ, lo cual refleja una constancia relativa en cuanto al tamaño de los complejos CMH-péptido a los cuales se unen. Las regiones CDR3 de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas son cortas y limitadas de manera similar en longitud, pero en las cadenas pesadas son en promedio más largas y de longitud más variable, en relación quizá con la necesidad de reconocer una gama extensa de epítopos. Llama mucho la atención de que los TCR γδ se asemejan a los anticuerpos en el hecho de que las asas CDR3 de la cadena γ son cortas, con una distribución estrecha de la longitud, mientras que en la cadena δ son largas y con una distribución amplia de la longitud. Por consiguiente, en este aspecto, el **TCR γδ se parece al anticuerpo** más que TCR αβ. En los últimos tiempos, se ha resuelto la estructura cristalográfica con rayos X de un TCR γδ unido a su ligando, la molécula no clásica T22 del CMH mencionada antes. En este ejemplo, el asa CDR3 que se extiende de la cadena δ, en particular el segmento Dδ2 codificado por una secuencia no mutada (línea germinal),

media la mayor parte de la unión, con una participación menor de la CDR3 de la cadena γ. Aunque las determinaciones estructurales de complejos adicionales TCR γδ-antígeno revelarán si este tipo de interacción es representativo de otros TCR γδ, la distribución amplia de la longitud de las diferentes asas Vδ de CDR3 sugiere que los TCR γδ generalmente tendrán, desde el punto de vista topográfico, sitios de unión más innovadores que los TCR de las células T αβ y, por lo tanto, facilitarán la capacidad de las células T γδ de interactuar con el antígeno intacto en lugar de hacerlo con el antígeno procesado.

Una subpoblación particular de células γδ, que tiene un espectro diverso de TCR y utiliza segmentos génicos *D* y *J* diferentes, pero que siempre emplea los mismos segmentos génicos *V*, *Vγ9 y Vδ2*, se expande in vivo para abarcar una gran proporción (hasta el 50%) de todas las células T de la sangre periférica en el curso de infecciones muy diversas. Estas células T *Vγ9Vδ2* reconocen alquilaminas y organofosfatos. En realidad, las células T *Vγ9Vδ2* pueden reconocer **tanto** alquilaminas con carga positiva **como** moléculas con carga negativa como las del fosfato de etilo. Sin embargo, esto debe ser bastante sencillo para el receptor dado el tamaño pequeño, similar al de los haptenos, de estos antígenos. Varios antígenos con alquilaminas son producidos por patógenos humanos, como *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Escherichia coli*.

Las características anteriores le confieren a las células γδ una función complementaria distinta de la de la población αβ y les permiten actuar en el reconocimiento de patógenos microbianos y de células del huésped que sufrieron daño o estrés. Resulta muy interesante que las células T γδ activadas pueden expresar moléculas clásica de clase II del CMH y coestimuladoras CD80/CD86 y, por lo tanto, actúan como células presentadoras de antígenos profesionales para la activación de las células Tαβ. Además, son capaces de facilitar indirectamente la presentación del antígeno debido a que su secreción de TNFα induce la expresión de moléculas de clase II y CD80/CD86 en las células dendríticas en reposo.

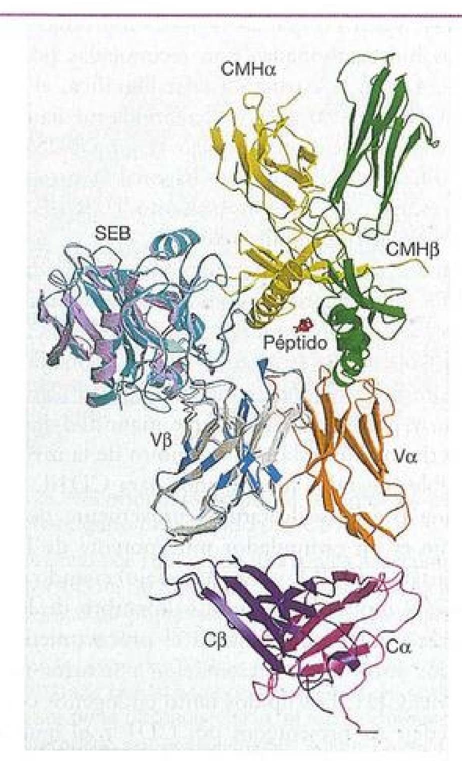


Figura 5.27. Interacción del superantígeno con el CMH y el TCR.

En este modelo compuesto, la interacción con el superantígeno enterotoxina B estafilocócica (SEB) comprende el SEB que se acuña entre la cadena Vβ del receptor de célula T (TCR) y el CMH, lo cual impide de manera eficaz la interacción entre el TCR y el péptido en la hendidura, y entre la cadena β del TCR y el CMH. De ahí que el contacto directo entre el TCR y el CMH se limita a los residuos de aminoácidos de Vα. (Reproducido de Li H. y col. [1999], *Annual Review of Immunology* **17**, 435, con autorización.) Otros superantígenos alteran de modo directo las interacciones del TCR con el complejo péptido-CMH en magnitudes variables, y en algunos casos (p. ej., el mitógeno de *Mycoplasma arthritidis*), no hay ningún contacto directo entre el TCR y el péptido-CMH.

Los superantígenos estimulan familias enteras de receptores de linfocitos

Las toxinas bacterianas representan un grupo importante de superantígenos para las células T

Mientras que un péptido individual que forma un complejo con el CMH reaccionará con las células T específicas para el antígeno, que representan un porcentaje relativamente pequeño de la dotación total de células T debido al requerimiento de la unión específica para regiones CDR3 particulares, se identificó una clase especial de molécula que estimula entre el 5 y el 20% de la población total de células T que expresa la misma estructura de la familia TCR Vβ. Estas moléculas prescinden de la especificidad antigénica del receptor; se conocen como **superantígenos** y no necesitan ser procesados por las células presentadoras de antígeno; en cambio, se producen entrecruzamientos de las moléculas de clase II y Vβ independientemente de la interacción directa entre las moléculas del CMH y el TCR (Figura 5.27).

La familia de superantígenos de la toxina piógena puede causar intoxicación alimentaria, vómitos y diarrea, y comprende las enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* (SEA, SEB y algunas otras), la toxina-1 del síndrome de shock tóxico estafilocócico (TSST-1), el superantígeno estreptocócico (SSA) y varias exotoxinas piógenas estreptocócicas (SPE). Si bien todas estas moléculas cuentan con una estructura similar, estimulan células T que tienen secuencias Vβ diferentes. Son mitógenos poderosos para estas células T en presencia de células que expresan moléculas de clase II del CMH. La SEA debe ser uno de los mitógenos más potentes de las células T conocidos y causa una marcada proliferación en un rango de concentración de 10^{-13} a 10^{-16}M. A semejanza de otros superantígenos, puede causar la "tormenta de citocinas", que implica la liberación de cantidades copiosas de citocinas, como IL-2, IFNγ, TNFα, TNFβ (linfotoxina) y otras citocinas y de leucotrienos por los mastocitos, que determinan su capacidad de ocasionar el síndrome de shock tóxico. Otros superantígenos que no pertenecen a la familia

de la toxina piógena son las toxinas exfoliativas estafilocócicas (ET), el mitógeno de *Mycoplasma arthritidis* (MAM) y el mitógeno de *Yersinia pseudotuberculosis*.

Los retrovirus endógenos pueden actuar como superantígenos

Hace muchos años, Festenstein hizo la curiosa observación de que las células B de ciertas cepas de ratones producían intensas respuestas proliferativas en alrededor del 20% de las células T no sensibilizadas provenientes de otra cepa de ratones con CMH idéntico. El denominado producto génico Mls responsable de incitar la proliferación es codificado por el marco de lectura abierto (*open reading frame*, ORF) localizado en la repetición terminal larga 3' de los virus tumorales mamarios murinos (MMTV). Se trata de retrovirus del tipo B transmitidos como agentes infecciosos en la leche y son específicos para las células B. Se asocian con la clase II del CMH en la membrana de la célula B y actúan como superantígenos a través de su afinidad por ciertas familias Vβ del TCR, de una manera similar a las toxinas bacterianas.

En los seres humanos, la infección de las células B por el virus de Epstein-Barr (EBV) transactiva el gen *env* HERV-K18 de un superantígeno retroviral endógeno. La activación policlonal de las células T también puede producirse en respuesta a antígenos de virus distintos de los retrovirus, por ejemplo, la proteína de la nucleocápside del virus de la rabia.

Los microorganismos también pueden proporcionar superantígenos a las células B

La proteína A estafilocócica no sólo reacciona con la región Fcγ de la IgG, sino también con el 15-50% de la IgM policlonal, la IgA y la fracción $F(ab')_2$ de la IgG, pertenecientes todos a la familia V_H3. Este superantígeno es mitógeno para las células B a través de su reconocimiento por una secuencia de unión discontinua compuesta por residuos de aminoácidos de FR1, CDR2 y FR3 del dominio V_H. La glucoproteína gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) también reacciona con inmunoglobulinas que emplean integrantes de la familia V_H3. El sitio de unión parece superponerse en parte con el de la proteína A y utiliza residuos de aminoácidos de FR1, CDR1, CDR2 y FR3.

El reconocimiento de formas diferentes del antígeno por las células B y T es ventajoso para el huésped

Es nuestra convicción que este apartado trata un tema de suma importancia que está en el epicentro de la inmunología.

Los anticuerpos combaten microorganismos y sus productos en los líquidos corporales extracelulares donde se hallan, en esencia, en su forma nativa (Figura 5.28a). Representa una clara ventaja para el huésped que el receptor de la célula B reconozca epítopos sobre las **moléculas nativas**.

Las células T αβ tienen una función bastante diferente. En el caso de las células T citotóxicas y las células T que secretan citocinas activadoras de los macrófagos infectados, tienen que buscar las células infectadas y unirse a éstas, y llevan a cabo su función efectora cara a cara con su objetivo. En primer lugar, respecto de las proteínas producidas por agentes infecciosos intracelulares, las moléculas del CMH le indican al linfocito T efector que han encontrando una célula. En segundo lugar, la célula T no quiere atacar a una célula no infectada en cuya superficie se asentó de manera accidental una molécula microbiana, ni quisiera tener su diana antigénica en la superficie de una célula adecuada bloqueada por un exceso de anticuerpos circulantes. Por ello, es beneficioso para la célula infectada expresar el antígeno microbiano en su superficie de un modo distinto del de la molécula nativa. Como ya será más que claro, la solución evolutiva fue hacer que la célula T reconociera un péptido procesado proveniente del antígeno intracelular y mantenerlo como un complejo con las moléculas de superficie del CMH. El receptor individual de la célula T reconoce entonces tanto al **marcador de la célula del CMH** como al **marcador peptídico de infección** en una misma operación (Figura 5.28b). Dado que prácticamente todas las células nucleadas pueden ser infectadas por algún virus u otro patógeno, es necesario que el marcador celular de la clase I del CMH sea expresado en todas las células nucleadas del cuerpo porque la muerte citotóxica requiere el contacto celular íntimo entre la célula T αβ $CD8^+$ efectora y la célula diana (infectada) que expresa moléculas de clase I. En cambio, la función de activación de la mayoría de las células T *helper* y T reguladoras (que como normalmente actúan mediante la

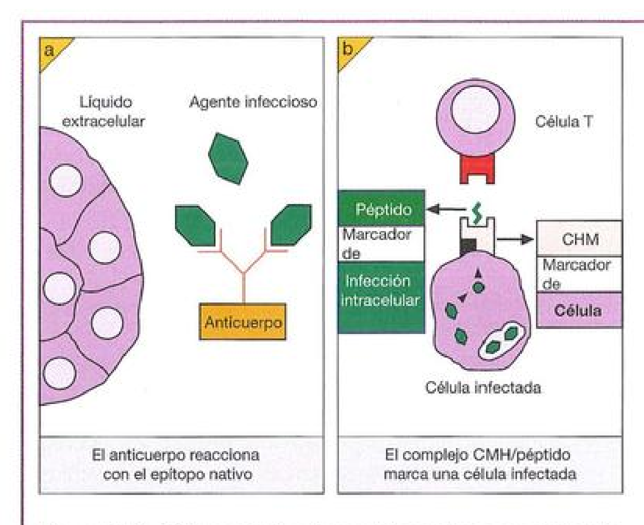


Figura 5.28. Diferencia fundamental en el reconocimiento del antígeno entre el anticuerpo y el receptor de célula T (TCR).

(a) Los anticuerpos se forman contra la forma nativa, no desnaturalizada, de los agentes infecciosos que son atacados en los líquidos extracelulares. (b) Las células T efectoras reconocen las células infectadas mediante dos marcadores de superficie: el CMH es una señal para la célula y el péptido extraño se encuentra en la hendidura del CMH ya que proviene de las proteínas de un agente infeccioso intracelular. Otras señales de la superficie celular microbiana pueden ser provistas por los antígenos no degradados y los antígenos de bajo peso molecular que contengan fosfato (reconocidos por las células T γδ), y lípidos y glucolípidos presentados por las moléculas CD1.

secreción de citocinas no es necesario que tomen contacto directo con las células sobre las que influyen) puede brindarse a las células a las células presentadoras de antígeno profesionales que, además de expresar la clase I del CMH, también expresan moléculas de clase II del CMH, necesarias para la presentación de péptidos a estas células T αβ $CD4^+$.

Una situación comparable se origina cuando las moléculas del CMH son sustituidas por las moléculas CD1 en la presentación del antígeno a las células T, caso en el cual la asociación tiene lugar con los lípidos y glucolípidos microbianos procesados. El papel fisiológico de las células γδ aún no se develó por completo.

RESUMEN

Reconocimiento del anticuerpo

- Los anticuerpos reconocen formas moleculares (epítopos) sobre los antígenos.
- La mayor parte de los epítopos de las proteínas son discontinuos y abarcan residuos importantes de diferentes sectores de la secuencia lineal de la proteína, aunque algunos son continuos y pueden ser imitados por los péptidos lineales.
- El sitio de combinación del anticuerpo forma una superficie complementaria del epítopo sobre el antígeno y en gran medida involucra las CDR del anticuerpo.
- Los sitios de combinación del anticuerpo pueden tener gran variedad de formas y tamaños; los anticuerpos dirigidos contra proteínas tienden a presentar superficies de reconocimiento más extensas que los dirigidos contra hidratos de carbono o péptidos, que más probablemente se encuentran en hendiduras o bolsillos.
- A veces, el anticuerpo y el antígeno pueden sufrir cambios locales en la conformación para permitir la interacción.

Inducción de anticuerpos

- La antigenicidad (capacidad de un antígeno de ser reconocido por los anticuerpos) se diferencia de la inmunogenicidad (capacidad de un antígeno [inmunógeno] para inducir la formación de anticuerpos cuando se utiliza en la inmunización de un animal).
- Las moléculas pequeñas de haptenos sólo inducen anticuerpos cuando se unen a una molécula proteica transportadora.
- Ciertos epítopos, en general los que presentan la máxima accesibilidad en la superficie de la proteína, por ejemplo, las asas (o bucles), inducen respuestas de anticuerpos mucho más intensas que los otros.
- Muchos virus, como el de la gripe y el HIV, utilizan la frecuente respuesta de los anticuerpos para centrarse en los epítopos inmunodominantes a fin de "evadir" el control de los anticuerpos.

Termodinámica de las interacciones anticuerpo-antígeno

- La interacción anticuerpo-antígeno es reversible y está sujeta a las leyes de la termodinámica.
- La tendencia del anticuerpo y el antígeno para interactuar se refleja en la constante de unión (K_a) y en la energía libre para la interacción (ΔG).
- Los anticuerpos fisiológicamente activos suelen tener constantes de unión del orden de 10^9/M ("ligadores nM").
- La energía de la interacción anticuerpo-antígeno está dominada por algunos "puntos calientes".
- La multivalencia puede aumentar en gran medida la afinidad del anticuerpo funcional con importantes consecuencias fisiológicas, por ejemplo, en la inactivación de la toxina.
- Los anticuerpos fisiológicamente activos de alta afinidad suelen mostrar afinidades mucho menores por antígenos distintos de sus antígenos diana, es decir, tienen baja reactividad cruzada.

Reconocimiento de las células T

- Las células T αβ reconocen al antígeno en asociación con las moléculas del CMH.
- Las células T están restringidas al haplotipo de la célula para la cual fueron sensibilizadas en un inicio.
- Los antígenos proteicos son procesados por las células presentadoras de antígenos para formar péptidos lineales pequeños que se asocian con las moléculas del CMH y se unen a la hendidura central formada por las hélices α y el piso por la hoja β.

Procesamiento del antígeno para la presentación por las moléculas de clase I del CMH

- Los antígenos citosólicos endógenos, como las proteínas virales, son escindidos por los **inmunoproteasomas** y los péptidos así formados son **transportados** al retículo endoplasmático (RE) por el sistema TAP 1/2.
- El péptido luego se disocia del sistema TAP 1/2 y forma un heterotrímero estable con la cadena pesada de clase I del CMH recientemente sintetizada y la $β_2$-microglobulina.
- Este **complejo péptido-CMH** es transportado después a la superficie para la presentación a las células T citotóxicas.

Procesamiento del antígeno para la presentación por las moléculas de clase II del CMH

- Las cadenas α y β de la **molécula clase II** se sintetizan en el RE y forman complejos con la **cadena invariable (Ii)** unida a la membrana.
- Esto facilita el transporte de las vesículas que contienen clase II a través del Golgi y las dirige a un endosoma tardío acidificado que contiene la proteína exógena captada en el interior de la célula por endocitosis o fagocitosis.
- La degradación proteolítica de Ii en los compartimientos enriquecidos con la clase II (MIIC) forma el péptido denominado CLIP, que protege la hendidura del CMH.
- El procesamiento por las proteasas endosómicas degrada el antígeno a péptidos que remplazan el CLIP.
- El complejo **molécula clase II-péptido** aparece ahora en la superficie celular para la presentación a las células T-*helper*.

Presentación cruzada

- Los antígenos exógenos también pueden ser presentados por las moléculas de clase I del CMH en las células dendríticas a través de un mecanismo posendocítico que implica la transferencia al interior del citosol por los cana-

les creados por el complejo multimolecular Sec61 seguido por el procesamiento convencional en los proteasomas.

- Por el contrario, la autofagia puede transferir péptidos y proteínas citosólicas al MIIC para la presentación ulterior por las moléculas de clase II.

Naturaleza del péptido

- Los péptidos clase I se mantienen en una conformación extendida dentro de la hendidura del CMH.
- Por lo común, tienen de 8 a 10 residuos de longitud y poseen dos o tres residuos de **anclaje** claves, relativamente invariables, que se unen a bolsillos específicos para los alelos en el CMH.
- Los péptidos clase II tienen entre 8 y 30 residuos de longitud, se extienden más allá de la hendidura y por lo común cuentan con tres o cuatro residuos de anclaje.
- Los otros residuos de aminoácidos en el péptido son muy variables y reconocidos por el receptor de células T (TCR).

Complejo entre TCR, CMH y péptido

- Las regiones hipervariables primera y segunda (CDR1 y CDR2) de cada cadena de TCR se ponen en contacto principalmente con las hélices α del CMH, mientras que las CDR3, que tienen la máxima variabilidad, interactúan con el péptido antigénico.

Algunas células T son independientes de las moléculas clásicas del CMH

- Las moléculas similares a las de clase I del CMH, como la H-2M murina, son relativamente no polimorfas y pueden presentar antígenos como los péptidos bacterianos *N*-formil metionina.
- La familia CD1 de moléculas similares a las de clase I que no pertenecen al CMH pueden presentar antígenos como lípidos y glucolípidos micobacterianos.
- Las células T γδ se asemejan a los anticuerpos porque reconocen moléculas enteras no procesadas, como moléculas no proteicas de bajo peso molecular que contienen fosfato.

Superantígenos

- Son mitógenos poderosos que estimulan subpoblaciones enteras de linfocitos que comparten la misma familia TCR Vβ o inmunoglobulina de la familia V_H, independientemente de la especificidad del antígeno.
- Las enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* son superantígenos humanos potentes que causan intoxicaciones alimentarias y el síndrome de shock tóxico.
- Los superantígenos de células T no son procesados, pero forman entrecruzamientos con las moléculas de clase II del CMH y TCR Vβ independientemente de su interacción directa.
- Los virus de los tumores mamarios murinos son retrovirus de las células B que actúan como superantígenos en el ratón.

El reconocimiento de formas diferentes del antígeno por las células B y las células T es una ventaja

- Las células B reconocen epítopos en el antígeno nativo; esto es importante porque los anticuerpos reaccionan con el antígeno nativo en el líquido extracelular.
- Las células T citotóxicas deben ponerse en contacto con las células infectadas, y para evitar la confusión entre los dos sistemas, la célula infectada en sí misma envía señales a la célula T mediante la combinación de moléculas de clase I del CMH y el antígeno degradado.
- Las células T *helper* y reguladoras también reconocen el antígeno que ha sido degradado a péptidos, pero en este caso el CMH implicado es la molécula de clase II que sólo se encuentra en las células presentadoras de antígeno profesionales.

LECTURAS ADICIONALES

Amigorena S. & Savina A. (2010) Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. Current Opinion in Immunology 22, 109–117.

Boes M., Stoppelenburg A.J. & Sillé F.C.M. (2009) Endosomal processing for antigen presentation by CD1 and class I major histocompatibility complex: roads to display or destruction. Immunology 127, 163–170.

Burton D.R., Stanfield R.L. & Wilson I.A. (2005) Antibody versus HIV in a clash of evolutionary titans. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 102, 14943–14948.

Chapman H.A. (2006) Endosomal proteases in antigen presentation. Current Opinion in Immunology 18, 78–84.

Crotzer V.L. & Blum J.S. (2009) Autophagy and its role on MHC-mediated antigen presentation. Journal of Immunology 182, 3335–3341.

Davies D.R. & Padlan E.A. (1990) Antibody–antigen complexes. Annual Reviews of Biochemistry 59, 439–473.

Davis S.J. et al. (2003) The nature of molecular recognition by T-cells. Nature Immunology 4, 217–224.

Finley D. (2009) Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. Annual Review of Biochemistry 78, 477–513.

Fraser J.D. & Proft T. (2008) The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. Immunological Reviews 255, 226–243.

Godfrey D.I., Rossjohn J. & McCluskey J. (2008) The fidelity, occasional promiscuity, and versatility of T cell receptor recognition. Immunity 28, 304–314.

Heath W.R. et al. (2004) Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. Immunological Reviews 199, 9–26.

Marrack P. et al. (2008) Evolutionarily conserved amino acids in TCR V regions and MHC control their interaction. Annual Review of Immunology 26, 171–203.

Moody D.B., Zajonc D.M. & Wilson I.A. (2005) Anatomy of CD1–lipid antigen complexes. Nature Reviews Immunology 5, 387–399.

Nowakowski A. et al. (2002) Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 99, 11346–11350.

Padlan E.A. (1994) Anatomy of the antibody molecule. Molecular Immunology 31, 169–217.

Procko E. et al. (2009) The mechanism of ABC transporters: general lessons from structural and functional studies of an antigenic peptide transporter. The FASEB Journal 23, 1287–1302.

Raghavan M., Cid N.D., Rizvi S.M. & Peters L.R. (2008) MHC class I assembly: out and about. Trends in Immunology 29, 436–443.
Rudd P.M. et al. (2001) Glycosylation and the immune system. Science 291, 2370–2376.
Speak A.O., Cerundolo V. & Platt F.M. (2008) CD1d presentation of glycolipids. Immunology and Cell Biology 86, 588–597.
Sundberg E.J. & Mariuzza R.A. (2002) Molecular recognition in antibody–antigen complexes. Advances in Protein Chemistry 61, 119–160.
Trombetta E.S. & Mellman I. (2005) Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. Annual Review of Immunology 23, 975–1028.
van den Eynde B.J. & Morel S. (2001) Differential processing of class I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. Current Opinion in Immunology 13, 147–153.
Wearsch P.A. & Cresswell P. (2008) The quality control of MHC class I peptide loading. Current Opinion in Cell Biology 20, 624–631.



CAPÍTULO 6
Métodos inmunológicos y aplicaciones

Conceptos clave

A modo de resumen...

Ahora que el lector está familiarizado con todos los elementos principales del sistema inmunitario innato y adaptativo, es oportuno examinar cómo se pueden manipular estos elementos *in vitro* e *in vivo*, ya sea para la búsqueda de un conocimiento mayor de la inmunidad o para el desarrollo de reactivos (principalmente basado en anticuerpos) que pueden utilizarse para un gran número de aplicaciones. También es muy útil saber cómo proceden los inmunólogos en la tarea de descubrir elconocimiento que animosamente hemos intentado resumir en estas páginas. Es de esperar que los métodos y las aplicaciones descritas en este capítulo permitan explicar cómo, en términos prácticos, se procedería para medir la producción de citocinas por subpoblaciones individuales de células T, para la producción de anticuerpos por las células B o de la apoptosis inducida por las células NK, y así sucesivamente.

Roitt's Essential Immunology, Twelfth Edition. Peter J. Delves, Seamus J. Martin, Dennis R. Burton, Ivan M. Roitt.

Introducción

Este capítulo está estructurado de modo que avanzaremos desde las técnicas moleculares basadas en células hasta los enfoques que utilizan animales. En un comienzo, consideraremos cómo pueden generarse y purificarse los anticuerpos, la forma en que a su vez éstos pueden utilizarse para purificar su antígeno específico a partir de mezclas complejas de antígenos, cómo pueden usarse para imitar desde el punto de vista funcional los ligandos naturales con el fin de estimular la función celular o, por el contrario, inhibir funciones específicas, así como muchas otras aplicaciones. Luego realizaremos una breve revisión acerca de una serie de variaciones sobre el tema de la utilización de anticuerpos para detectar el antígeno en células, tejidos, líquidos corporales, así como en soportes sólidos (como matrices de proteínas) y también examinaremos cómo pueden mapearse regiones separadas dentro de un antígeno que son reconocidas por anticuerpos o receptores de células T (es decir, sus epítopos específicos). La segunda mitad del capítulo está dedicada a los métodos basados en células que se utilizan para evaluar la funcionalidad y las interacciones entre las células del sistema inmunitario. Analizaremos cómo estas células pueden ser aisladas, fenotipificadas, evaluadas en cuanto a su funcionalidad y manipuladas genéticamente *in vitro* e *in vivo*. Después examinaremos algunos de los modelos animales que son utilizados habitualmente por los inmunólogos y cómo pueden producirse animales diseñados por ingeniería genética.

Muchos de los procedimientos que describimos en este capítulo han sido minuciosamente desarrollados y perfeccionados por varias generaciones de inmunólogos, y varían desde los simples a los muy complejos. Es aleccionador que se le recuerde que, cuando hacemos afirmaciones como "se generó un anticuerpo", de modo característico, el trabajo para ello insumió muchos meses, incluso años. Del mismo modo, mientras que para decir "el gen fue desactivado en el ratón" se tarda tan sólo dos segundos, el tiempo que llevó desarrollar el procedimiento en sí insumió un par de años.

Elaboración de anticuerpos por encargo

Además de ser bastante competentes para proteger a nuestro cuerpo de los agentes infecciosos perjudiciales, los anticuerpos también son reactivos de suma utilidad y exquisitamente específicos para detectar y cuantificar otras proteínas, así como una gran variedad de sustancias. Los anticuerpos tienen, en un sentido bastante literal, numerosas aplicaciones prácticas, que varían desde la purificación de proteínas mediante columnas de afinidad basadas en el empleo de aquéllos, la detección de hormonas circulantes en muestras de sangre u orina para el diagnóstico clínico, la investigación de la expresión y la localización de proteínas subcelulares, hasta su empleo como agentes inmunoterápicos en el tratamiento del cáncer y como antídotos para las mordeduras de serpientes o de arañas. En realidad, para el investigador científico resulta muy difícil considerar un mundo sin anticuerpos, ya que estas moléculas se utilizan a diario como sondas muy específicas y fiables para casi todas las proteínas existentes en innumerables contextos. Ahora, haremos una revisión, en términos prácticos, de cómo pueden producirse en el laboratorio estas proteínas maravillosamente adaptables.

Generación de anticuerpos policlonales

Aunque pueden formarse anticuerpos contra casi todas las sustancias orgánicas, algunas moléculas inducen respuestas de anticuerpos con mucha más facilidad que otras. Las proteínas suelen ser inmunógenos excelentes (es decir, sustancias capaces de inducir una respuesta inmunitaria) aunque típicamente la respuesta inmunitaria se concentra contra pequeñas regiones dentro de la proteína (denominadas epítopos o determinantes antigénicos) que están representadas por alrededor de cinco a ocho aminoácidos. Como se describió antes (Capítulo 5), un epítopo representa la estructura mínima requerida para el reconocimiento por el anticuerpo, y una molécula relativamente grande, como una proteína, suele contener múltiples epítopos. Así, la inyección de un antígeno común en un animal casi siempre induce la producción de una mezcla de anticuerpos que se dirigen contra epítopos diferentes dentro del antígeno. También es muy posible que algunos de los anticuerpos dentro de esta mezcla se dirijan hacia epítopos que se encuentran asimismo en otros antígenos. Se dice que estos anticuerpos reaccionan en forma cruzada contra el otro antígeno al que también se unen. Las moléculas orgánicas pequeñas son, por lo común, escasamente inmunógenas cuando se las inyecta solas; el sistema inmunitario parece incapaz de reconocer estas estructuras de manera eficiente. No obstante, los inmunólogos descubrieron que estas moléculas pueden hacerse visibles al sistema inmunitario mediante el acoplamiento covalente con una proteína transportadora, como la albúmina sérica bovina (ASB), que en sí misma es inmunógena. Estas moléculas se conocen como haptenos (véase la Figura 5.6).

Para generar un anticuerpo contra una proteína determinada, el procedimiento usual es inyectar muestras pequeñas de la proteína (en el orden del microgramo) en un animal como el conejo. Sin embargo, la administración de antígeno solo rara vez es suficiente para inducir una respuesta inmunitaria potente, aun cuando el antígeno esté compuesto por una proporción alta de determinantes no propios; se requiere la administración conjunta de un **adyuvante** (Figura 6.1). Si bien no está completamente claro el mecanismo exacto de acción de los adyuvantes, una función des-

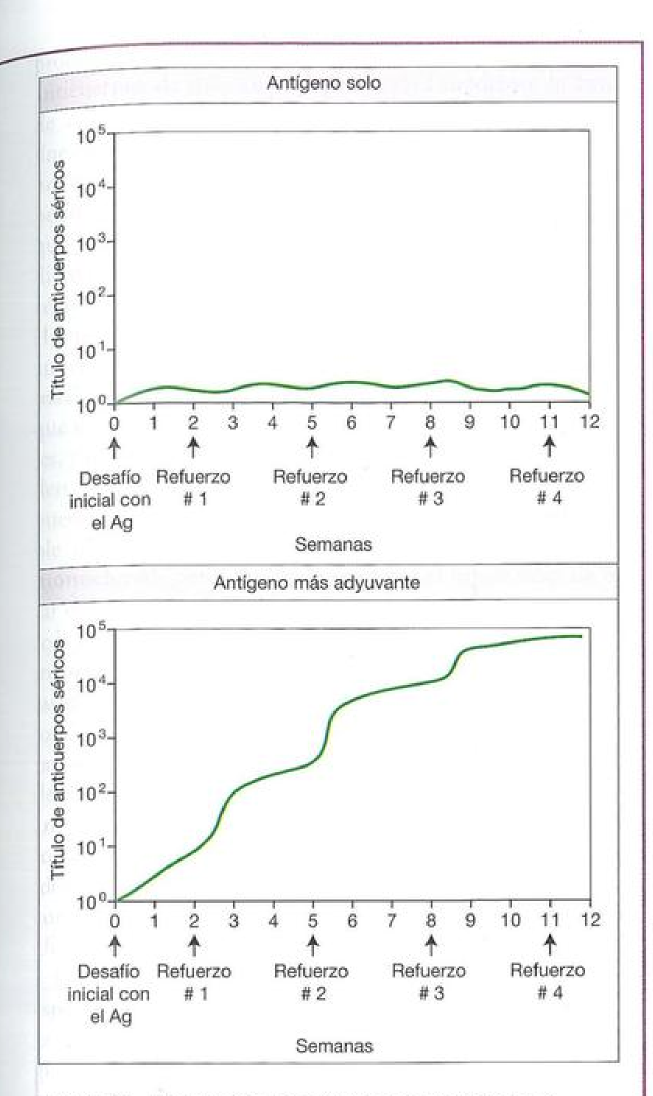


Figura 6.1. Producción de anticuerpos policlonales.

Es necesaria la inmunización repetida con el antígeno (Ag) más el adyuvante para generar respuestas de anticuerpos eficaces, ya que la inmunización con el antígeno solo suele ser ineficaz. Los antisueros policlonales son generados mediante la inmunización, con una combinación de antígeno más adyuvante, varias veces en un período de 12 semanas. El título de anticuerpos séricos (es decir, la máxima dilución que da una prueba positiva) con frecuencia aumenta después de cada refuerzo sucesivo con el antígeno.

tacada de éstos es **activar las células dendríticas y otras células presentadoras de antígenos (CPA)** en el sitio donde se libera el antígeno (véase p. 32). Recuérdese del Capítulo 1 que la activación de las CPA refuerza de manera notoria su capacidad de proporcionar señales coestimuladoras necesarias para la activación eficaz de las células T y B tras el encuentro con el antígeno. El lector recordará que se necesitan los patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP) para inducir la maduración de las células dendríticas y activar su movilización a los tejidos linfoides secundarios a fin de presentar los antígenos no propios a las células T, que a su vez proporciona ayuda dependiente de la célula T a las células B para que se produzca el cambio de clase, la maduración de la afinidad y la producción óptima de anticuerpos. Los adyuvantes potentes suelen ser preparados crudos de extractos bacterianos que contienen mezclas de ligandos para el receptor de tipo Toll (TLR), como lipopolisacáridos (LPS) o peptidoglucano. En esencia, casi todos los adyuvantes son mezclas de PAMP que activan las células dendríticas y otras células del sistema inmunitario innato a través de sus receptores de reconocimiento de patrón (PRR). Como las células dendríticas son incapaces de proporcionar señales coestimuladoras a menos que sean activadas a través de sus PRR, los antígenos que carecen de su actividad de unión al PRR no activarán las células dendríticas y, por consiguiente, no inducirán de por sí una respuesta inmunitaria intensa.

Como se señaló en el Capítulo 2, puesto que una sola dosis de antígeno suele inducir una respuesta relativamente leve (véase la Figura 2.13), el antígeno es inyectado varias veces en un período de alrededor de 12 semanas. Durante este tiempo, aumentará la concentración de anticuerpos (que suele conocerse como **título de anticuerpos**) dirigidos contra el inmunógeno (Figura 6.1). Si todo transcurre de un modo conveniente, se tendrá un antisuero *enriquecido* con anticuerpos contra la proteína de interés y ahora puede usarse como sonda en muchos contextos diferentes: para localizar un antígeno dentro de una célula, cuantificarlo dentro de una mezcla de otros antígenos, neutralizar su actividad biológica y muchas otras aplicaciones (que se describen más adelante en este capítulo).

Es importante recordar aquí que los antisueros generados de esta manera también contendrán cantidades considerables de otros anticuerpos (dirigidos contra una variedad de determinantes) que el animal pudo haber formado en el pasado reciente. Estos anticuerpos suelen presentar un título significativamente menor que los dirigidos contra el antígeno que fue utilizado en forma repetida para la inmunización, pero pueden causar problemas y quizá sea necesario eliminarlos de nuestro antisuero para diversas aplicaciones. Por suerte, esto puede lograrse mediante la **purificación por afinidad,** en la que el antígeno específico está inmovilizado sobre una matriz sólida y se utiliza para "sacar" su anticuerpo específico de una mezcla cruda de anticuerpos (véase la Figura 6.6).

Dado que muchos antígenos contienen varios epítopos separados, los antisueros generados por la inyección de antígeno contendrán una mezcla de anticuerpos dirigidos contra distintos determinantes antigénicos sobre la molécula. Algunos de estos anticuerpos se unirán al antígeno con gran avidez, otros no lo harán; algunos reconocerán la forma original del antígeno, mientras que otros aún reconocerán al antígeno tras la desnaturalización para eliminar la estructura terciaria. Se dice que estos antisueros son **policlonales,** ya que contienen una mezcla de anticuerpos que, de manera predominante aunque no exclusiva, se dirigen contra el inmunógeno para el cual se formaron.

La revolución de los anticuerpos monoclonales

Primero en roedores

Georges Köhler y César Milstein lograron un descubrimiento tecnológico fantástico: diseñaron una técnica para la

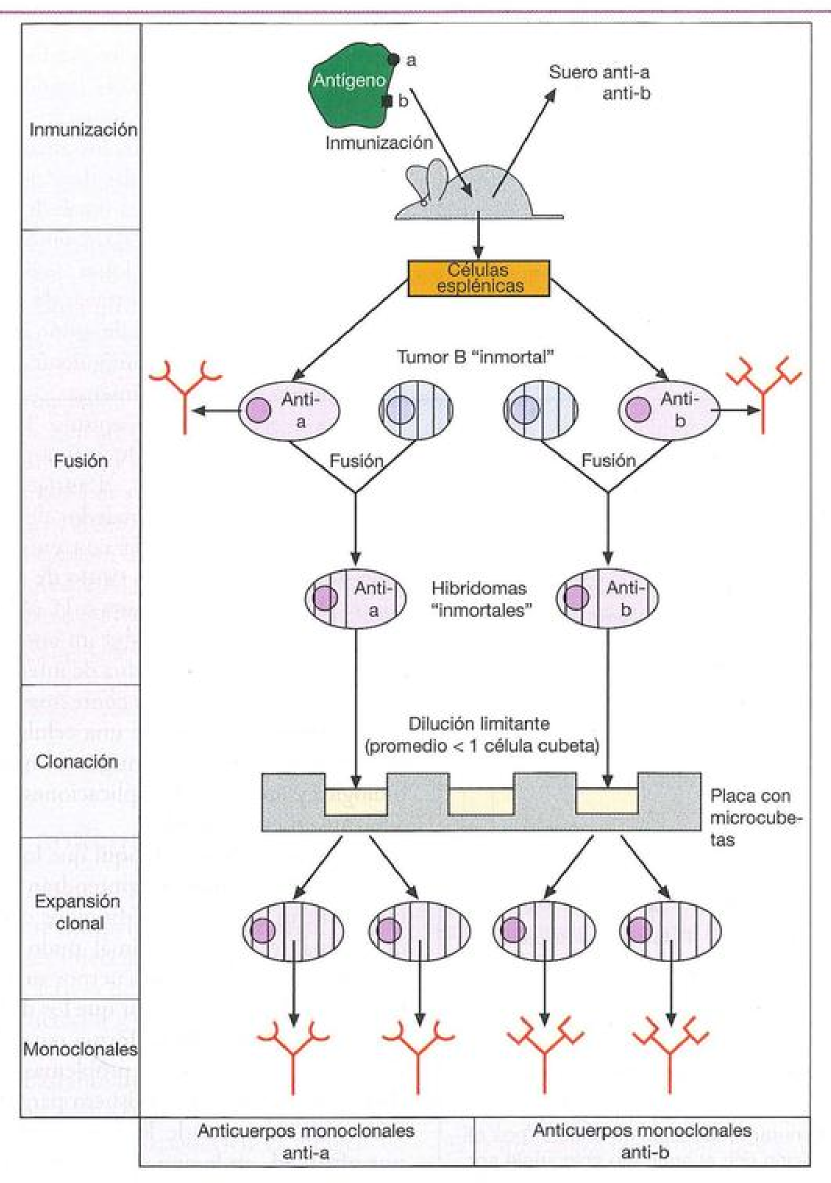


Figura 6.2. Producción de anticuerpos monoclonales.

Los ratones inmunizados con un antígeno que tenga, por ejemplo, dos epítopos, a y b, desarrollan células esplénicas que producen anticuerpos anti-a y anti-b que aparecen como anticuerpos séricos. Se extirpa el bazo y las células aisladas se fusionan, en presencia de polietilenglicol, con células de un tumor de células B en constante división (es decir, "inmortales") seleccionadas por una deficiencia de enzimas purínicas y por lo común por su incapacidad de secretar Ig. Las células resultantes son distribuidas en placas con pocillos en medio HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina), que destruye la fusión de las parejas.
Estas células se siembran en diluciones; en promedio, cada pocillo contendrá menos de una célula de hibridoma. Cada hibridoma, es decir, el producto de la fusión de una única célula formadora de anticuerpo y una célula tumoral, tendrá la capacidad de la primera de secretar una única especie de anticuerpo y la inmortalidad de la segunda para proliferar en forma continua.
Así, la progenie clonal puede proporcionar un aporte inacabable de anticuerpos con una única especificidad, o sea, un anticuerpo monoclonal. En este ejemplo consideramos la producción de hibridomas con especificidad para dos epítopos solamente, pero la misma técnica permite la formación de anticuerpos monoclonales contra mezclas complejas de antígenos con múltiples epítopos. Las fusiones que utilizan células de rata en lugar de ratón pueden tener ciertas ventajas ya que proporcionan una tasa mayor de hibridomas estables y de anticuerpos monoclonales mejores para fijar el complemento humano, un atributo útil en el contexto de las aplicaciones terapéuticas a seres humanos que implican la depleción celular.
Naturalmente, para el uso en los seres humanos, la solución ideal es la producción de anticuerpos monoclonales completamente humanos. No se encontró una amplia aceptación en la fusión de parejas de mielomas humanos porque tienden a una baja eficacia de fusión, un crecimiento deficiente y la secreción de Ig del mieloma que diluye el anticuerpo monoclonal deseado. Un heterohibridoma no secretor obtenido por fusión de un mieloma murino con células B humanas puede ser utilizado como una pareja de fusión productiva para células B humanas productoras de anticuerpos. Otros grupos se han transformado a parejas de fusión murina bien caracterizadas, y los heterohibridomas así formados crecen bien, clonan con facilidad y son productivos. Existe cierta inestabilidad derivada de la pérdida de cromosomas y parece ser que la producción de anticuerpos se mantiene por la translocación de genes *Ig* humanos a los cromosomas murinos. La frecuencia de fusión es aún mejor si se utilizan líneas transformadas por el virus de Epstein-Barr (EBV) en lugar de células B.

producción de clones "inmortales" de células que elaboran anticuerpos de una única especificidad mediante la fusión de células formadoras de anticuerpos normales con una línea tumoral adecuada de células B. Las células B normales no transformadas no pueden crecer en cultivos durante períodos prolongados y mueren de modo rápido a menos que sean inmortalizadas. Este método de cambio de paradigma realmente permite que los clones individuales de células B crezcan en cultivos de tejidos y se expandan hasta el punto en que se pueden producir cantidades enormes de anticuerpos específicos para el antígeno. Estos "**hibridomas**" son seleccionados en un medio de cultivo de tejido que no favorece el crecimiento de los tipos celulares originales, y por diluciones sucesivas o por siembra en placa se pueden establecer clones individuales (Figura 6.2). Estos clones pueden desarrollarse en líquido ascítico de ratones y es posible obtener títulos bastante importantes del **anticuerpo monoclonal**; pero, teniendo presente el imperativo de evitar el empleo de animales siempre que sea posible, se prefiere la propagación en cultivos en gran escala. Recuérdese que, incluso en un buen antisuero, más del 90% de las moléculas de Ig tienen escasa o ninguna avidez por el antígeno, y los "anticuerpos específicos" propiamente dichos representan un espectro completo de moléculas con diferente grado de avidez, dirigidas contra los distintos determinantes del antígeno. Por el contrario, en los anticuerpos monoclonales todas las moléculas producidas por un hibridoma dado son idénticas: tienen la misma clase y el mismo alotipo de Ig, así como la misma región variable y una estructura, idiotipo, afinidad y especificidad idénticos para un epítopo dado.

La gran cantidad de Ig inespecífica, en relación con la específica, para el antígeno en un antisuero significa que la unión antigénica de base en cualquier prueba inmunológica puede ser extremadamente alta. Este problema se reduce en gran parte con la preparación de un anticuerpo monoclonal, ya que todo el anticuerpo es específico para el antígeno y, en consecuencia, brinda una relación "señal:interferencia" muy superior. Como están dirigidos contra epítopos únicos en el antígeno, los anticuerpos monoclonales muestran con frecuencia una especificidad elevada en relación con su baja reactividad cruzada con otros antígenos.

La ventaja principal de los anticuerpos monoclonales como reactivos es que proporcionan un único material estándar para todos los laboratorios en todo el mundo, en un aporte ilimitado si se mantiene la inmortalidad y la pureza de la línea celular; por otra parte, los antisueros obtenidos de animales diferentes pueden ser tan distintos entre sí como la tiza y el queso. El enfoque monoclonal de nuevo muestra su excelencia en relación con las estrategias convencionales para la producción de anticuerpos específicos contra componentes individuales en una mezcla compleja de antígenos. Los usos de los anticuerpos monoclonales son múltiples e incluyen: inmunoensayos, diagnóstico de cáncer, tipificación de tejidos, serotipificación de microorganismos, separación de tipos celulares individuales con marcadores de superficie específicos (p. ej., subpoblaciones de linfocitos), neutralización terapéutica de citocinas inflamatorias y terapéutica de la "bala mágica" con agentes citotóxicos acoplados a anticuerpos específicos antitumorales; estas y muchas otras áreas fueron transformadas por la tecnología de los hibridomas.

Anticuerpos catalíticos

Un desarrollo especialmente interesante, con enorme potencial, es el reconocimiento de que un anticuerpo monoclonal contra un análogo estable del estado de transición de una reacción dada puede actuar como una enzima (abzima) y catalizar esa reacción. La posibilidad de generar enzimas por encargo promete un futuro muy atractivo, y algunas maniobras químicas sumamente hábiles ya han extendido el espectro de reacciones que pueden ser catalizadas de esta manera. Una demostración reciente de la escisión de un péptido de secuencia específica con un anticuerpo que incorpora un cofactor metálico complejo aumentó el interés de los *conocedores* del tema, ya que ésta es una reacción dificultosa desde el punto de vista energético que tiene una enorme variedad de aplicaciones. Otro enfoque innovador es inmunizar con un antígeno altamente reactivo mediante el cual se produzca una reacción química en el sitio de combinación del anticuerpo. Esto recluta anticuerpos que no sólo son complementarios para la sustancia química activa, sino que también tiene probablemente cierto poder enzimático sobre el complejo inmunógeno-sustrato. Por ello, cuando se emplea esta estrategia se obtiene un anticuerpo con una especificidad por el sustrato excepcionalmente amplia para la catálisis eficaz de las reacciones de aldol y retroaldol. Una característica importante de este anticuerpo es la presencia de una lisina reactiva contenida en un bolsillo hidrófobo del sitio de unión. El anticuerpo mantiene su actividad catalítica durante varias semanas tras la inoculación intravenosa en ratones y posee un potencial terapéutico en una diversidad de tratamientos a base de profármacos con enzimas dirigidas por anticuerpos, en donde el componente enzimático es un anticuerpo catalítico.

Grandes genotecas combinatorias de anticuerpos, creadas por asociación al azar entre dotaciones de cadenas pesadas y ligeras y expresadas en los bacteriófagos (véase más adelante), pueden ser seleccionadas por los anticuerpos catalíticos mediante el empleo del sustrato en un estado de fase sólida. La escisión por el anticuerpo catalítico deja un producto en fase sólida que puede identificarse ahora por un sistema de anticuerpo doble que utiliza anticuerpos específicos para el producto como diferenciado del sustrato.

Un campo de gran interés es la presencia de autoanticuerpos catalíticos descritos en ciertos grupos de pacientes, con anticuerpos hidrolíticos contra el péptido intestinal vasoactivo, el DNA y la tiroglobulina. En los últimos tiempos, se descubrieron también anticuerpos catalíticos capaces de producir la hidrólisis del factor VIII en pacientes hemofílicos que lo reciben: los anticuerpos que impiden la función de la coagulación del factor VIII.

Pueden elaborarse anticuerpos monoclonales humanos

Si bien los científicos comprendieron con rapidez que los anticuerpos monoclonales constituirían agentes terapéuticos

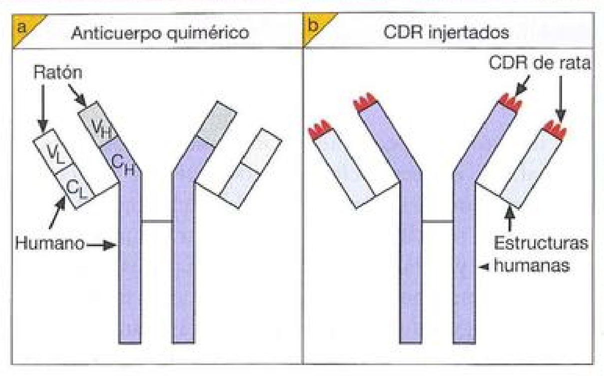


Figura 6.3. Especificidades de anticuerpos de roedores diseñados por ingeniería genética en el anticuerpo humano.

a) Anticuerpo quimérico con las regiones variables de ratón fusionadas con las regiones constantes de la Ig humana.
b) Anticuerpo monoclonal de rata "humanizado" en el cual segmentos génicos que codifican los seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) son injertados en una estructura de Ig humana.

potentes y muy específicos, en particular para el tratamiento del cáncer, su utilización resultó bastante más difícil de lo que se creyó en un principio. Los anticuerpos monoclonales de ratón inoculados en seres humanos con fines terapéuticos son intensamente inmunógenos, y los anticuerpos humanos antimurinos (HAMA en el comercio; del inglés *h*uman *a*nti-*m*ouse *a*ntibodies) así formados representan un obstáculo serio, ya que aceleran la depuración de los anticuerpos monoclonales de la sangre y es posible que produzcan reacciones de hipersensibilidad. Asimismo, impiden que el anticuerpo del ratón alcance su diana y, en algunos casos, bloquean su unión con el antígeno. En ciertas circunstancias, es concebible que un anticuerpo monoclonal de ratón captado por una célula tumoral pueda ser procesado y se transforme en el sitio de unión al CMH de las células T citotóxicas, o que ayude a reforzar la respuesta contra un antígeno débilmente inmunógeno, localizado sobre la superficie de la célula tumoral. Sin embargo, en general la lógica apunta a la eliminación de las porciones xenogénicas (extrañas) del anticuerpo monoclonal y su remplazo por estructuras de Ig humana mediante el empleo de tecnología de DNA recombinante. Las construcciones quiméricas, en las que los dominios V_H y V_L del ratón se empalman con los genes C_H y C_L humanos (Figura 6.3a), son mucho menos inmunógenos en los seres humanos.

Un procedimiento más refinado es injertar las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una anticuerpo monoclonal murino de alta afinidad sobre una estructura de Ig completamente humana sin pérdida de la reactividad específica (Figura 6.3b). Sin embargo, este no es un ejercicio trivial, y el objetivo de fusionar las células B humanas para crear hibridomas es todavía atractivo, teniendo en cuenta no sólo la importante reducción en la inmunogenicidad, sino también el hecho de que puedan crearse anticuerpos dentro de una especie contra diferencias sutiles, como complejos polimorfos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y antígenos asociados a tumores en otros individuos. Por el contrario, las respuestas xenogénicas están más dirigidas a estructuras inmunodominantes comunes para la mayoría de los individuos, lo cual hace más difícil la producción de anticuerpos específicos de variantes. A pesar de las dificultades para encontrar parejas con buena fusión, se han obtenido grandes cantidades de anticuerpos monoclonales humanos. Surge una restricción adicional porque las células B de la sangre periférica, que son las únicas células B de fácil obtención en los seres humanos, no suelen ser consideradas como una buena fuente de células formadoras de anticuerpos.

Las líneas de células B inmortalizadas transformadas por el virus de Epstein-Barr también se utilizaron como una fuente de anticuerpos monoclonales humanos. Aunque a menudo éstas producen anticuerpos IgM de afinidad relativamente baja, en ciertos casos se obtienen algunos anticuerpos IgG útiles de mayor afinidad. Con frecuencia, las líneas celulares pierden su capacidad de secretar anticuerpos si son cultivadas durante largos períodos, aunque en ocasiones pueden ser rescatadas por fusión con una línea de células de mieloma para producir hibridomas, o los genes pueden ser aislados y utilizados en la formación de anticuerpos recombinantes.

Un enfoque radicalmente distinto implica la producción de cepas transgénicas de xenorratón en las cuales se introducen locus de la Ig *H* y la cadena ligera κ no reordenados por el tamaño de las megabases en ratones cuyos genes *Ig* murinos endógenos habían sido inactivados. La inmunización de estos ratones genera anticuerpos humanos de alta afinidad (10^{-10}–10^{-11} M) que pueden aislarse mediante el uso de hibridomas o técnicas recombinantes. Con el empleo de estos ratones, ya se han obtenido agentes antiinflamatorios (anti-IL-8) y antitumorales (antirreceptor para el factor de crecimiento epidérmico) potentes.

Existe aún el obstáculo de que incluso los anticuerpos humanos pueden provocar respuestas antiidiotipo; éstos pueden haber sido engañados por el uso de anticuerpos obtenidos mediante ingeniería genética que tengan diferentes idiotipos por inoculaciones posteriores. Incluso sería más deseable que los receptores futuros pudieran tornarse primero en tolerantes al idiotipo, quizá por la coadministración del anticuerpo terapéutico con un anti-CD4 que no produzca depleción.

A pesar de las dificultades inherentes, muchos anticuerpos monoclonales humanizados ya han sido aprobados para uso terapéutico, como: anti-IL-2 (en rechazos de trasplante renal), anti-VEGF (en cáncer colorrectal), anti-TNFα (en artritis reumatoide), anti-CD11a (en psoriasis), anti-CD52 (en leucemia linfocítica crónica de células B), anti-CD33 (en leucemia mieloide aguda), anti-HER2 (en algunos cánceres metastásicos de mama) y algunos otros (véase el Cuadro 17.2). En la actualidad, muchos más se encuentran en la etapa de ensayos clínicos y es probable que en los próximos años se utilicen en forma sistemática en la práctica clínica.

Anticuerpos diseñados por ingeniería genética

Hay otras maneras de sortear los problemas asociados con la producción de anticuerpos monoclonales humanos que se aprovechan de los ardides de la biología molecular moderna. Ya se hizo referencia a los anticuerpos "humanizados" de roedores (Figura 6.3), pero una importante estrategia nueva, basada en la **expresión** y la **selección de bacteriófagos**, ha

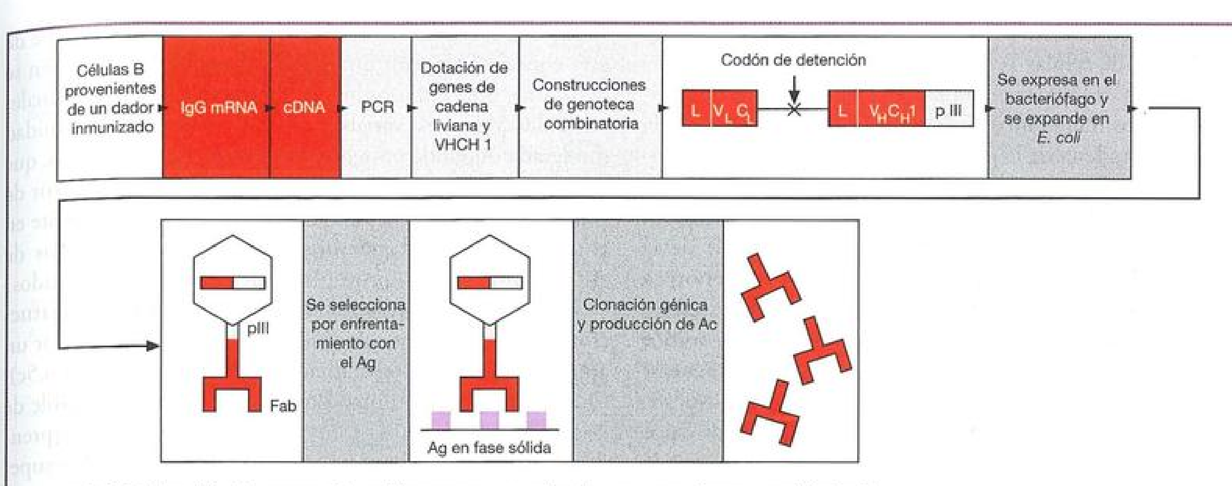


Figura 6.4. Selección de genes de anticuerpos a partir de una genoteca combinatoria.

Se utilizaron células B provenientes de un dador inmunizado (en un experimento importante, las células de memoria de la sangre periférica humana recibieron un refuerzo con el antígeno toxoide tetánico después de la transferencia a ratones SCID; Duchosal M.A. y col. [1992], *Nature* **355**, 258) para la extracción de genes de IgG mRNA y cadena ligera ($V_L C_L$) y $V_H C_H$ *I* (que codifican Fab) combinados al azar en construcciones fusionadas con el gen de proteína de cubierta pIII del bacteriófago, como se muestra. Éstos fueron incorporados en fagémidos como pHEN1 y expandidos en *E. coli.* Tras la infección mediante el fago auxiliar, se seleccionaron los fagos recombinantes con la máxima afinidad mediante ciclos de enfrentamiento con el antígeno en fase sólida de modo que los genes que codifican los Fab puedan ser clonados. L, secuencia bacteriana líder.

Figura 6.5. Otros anticuerpos diseñados por ingeniería genética.

a) Un gen único que codifica V_H y V_L unido por una secuencia de longitud apropiada da origen a un fragmento de unión al antígeno Fv de cadena simple (scFv). b) Es posible aumentar la afinidad del anticuerpo mediante la mutagénesis específica de los residuos en la región determinante de la complementariedad (CDR) o en sus adyacencias. c) Dos construcciones scFv expresadas de modo simultáneo se asociarán para formar un "dianticuerpo" con dos especificidades. Estos anticuerpos biespecíficos tienen varios usos. Obsérvese que un anticuerpo biespecífico dirigido contra dos epítopos diferentes situados en el mismo antígeno tiene una afinidad mayor debido al "efecto de bonificación" de cooperación entre los dos sitios de unión d) Se pueden construir posibles "balas mágicas" mediante la fusión del gen para una toxina (p. ej., ricina) con el Fab.

logrado una posición prominente. En esencia, el mRNA proveniente de células B humanas sensibilizadas se convierte en cDNA (DNA complementario) y los genes de anticuerpos, o los fragmentos de éstos, son multiplicados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Luego se elaboran construcciones únicas en las que se permite que los genes de las cadenas ligera y pesada se combinen al azar en tándem con los genes que codifican la proteína III de la cubierta del bacteriófago (pIII) (Figura 6.4). Esta **genoteca combinatoria**, que contiene la mayoría de los genes de las cadenas pesada y ligera con apareamientos al azar, codifica un repertorio grande de anticuerpos (o sus fragmentos) expresados como proteínas de fusión con pIII en la superficie del bacteriófago. El número sumamente elevado de fagos obtenido mediante la infección de *E. coli* ahora puede enfrentarse con antígenos en fase sólida para seleccionar aquellos anticuerpos adheridos a su superficie que tienen la máxima afinidad (Figura 6.4). Debido a que los genes que codifican estos anticuerpos de máxima afinidad ya están presentes dentro del fago seleccionado, pueden clonarse con facilidad y expresar grandes cantidades de anticuerpos. Cabe destacar que este procedimiento de **selección** tiene una gran ventaja con respecto a otras técnicas que emplean la **detección**, porque el número de fagos que pueden examinarse es varios logaritmos mayor.

También se establecieron genotecas combinatorias utilizando mRNA proveniente de donantes humanos **no inmunizados**. Los genes V_H, V_k y V_l son expandidos al azar por PCR y recombinados para formar construcciones Fv de cadenas simples (*single chain Fv*, scFv) (Figura 6-5a) fusionadas con la pIII del fago. Se obtuvieron fragmentos solubles que se unen a una variedad de antígenos. Tienen interés especial aquellos que son autoanticuerpos contra moléculas con posibilidades terapéuticas como CD4 y factor de necrosis tumoral α (TNFα); los linfocitos que expresan estos autoanticuerpos no podrían obtenerse por inmunización normal, ya que es probable que se hagan tolerantes, pero las recombinaciones al azar de V_H y V_L pueden producir especificidades completamente nuevas bajo condiciones in vitro en las que no intervienen los mecanismos de tolerancia.

Aunque es una operación en "tubo de ensayo", este enfoque para la generación de anticuerpos específicos se asemeja a la maduración de la afinidad de la respuesta inmunitaria *in vivo* (véase p. 254) en el sentido de que el antígeno es el factor determinante en la selección de los anticuerpos que responden con la máxima afinidad.

Con el objeto de incrementar las afinidades de los anticuerpos producidos por estas técnicas, pueden utilizarse antígenos para seleccionar los mutantes de mayor afinidad producidos por mutagénesis al azar o, incluso de modo más eficaz, por sustituciones dirigidas al sitio en los puntos calientes mutacionales (Figura 6.5b), imitando de nuevo la respuesta inmunitaria natural que comprende la mutación al azar y la selección antigénica (véase pp. 249-252). La afinidad también fue mejorada mediante un procedimiento de recombinación aleatoria del DNA denominado "barajado" (*shuffling*), en la cual un gen V_H que codifica un anticuerpo de afinidad razonable se combina al azar con una mezcla de genes V_L y es sometido a la selección del antígeno. El proceso se puede ampliar más aun mezclando el V_L proveniente de esta combinación con una mezcla de genes V_H. También se demostró que era posible recombinar CDR individuales entre las regiones variables de anticuerpos con afinidad moderada obtenida por enfrentamiento con el antígeno, que en consecuencia crea anticuerpos de alta afinidad a partir de genotecas relativamente pequeñas. Otro enfoque consiste en el aislamiento de fragmentos V_{HH} de cadenas pesadas de anticuerpos de llama proveniente de animales inmunizados.

Se crearon otros anticuerpos novedosos. En una construcción, dos fragmentos scFv fueron asociados para formar un anticuerpo con dos especificidades diferentes (Figura 6.5c). Otra consiste en un único dominio de la región variable de la cadena pesada (DAB) cuya afinidad puede ser sorprendentemente alta, del orden de 20 nM. Si fuera posible superar la "adhesividad" de estos minianticuerpos, su tamaño pequeño podría aprovecharse para la penetración en los tejidos. El diseño de "balas mágicas" para la inmunoterapia puede estar basado en la fusión de una toxina (p. ej., ricina) a la fracción Fab de un anticuerpo (Figura 6.5d).

Campos de anticuerpos

Los genes para un anticuerpo monoclonal no sólo pueden estar expresados en grandes cantidades en la leche de animales lactantes, sino también en las plantas que pueden ser aprovechadas para este propósito. Los denominados "**planticuerpos**" se expresaron en plátanos, patatas y plantas de tabaco. Es posible imaginar un agricultor de alta tecnología que atrae la atención de un visitante confundido en un campo en el que crece toxoide antitetánico, otro polisacárido antimeningocócico, etc. Las plantas multifuncionales podrían ser bastante lucrativas porque las raíces se cosecharían como comestibles y las hojas expresarían algún producto génico deseable. ¡Con este ritmo, no debe quedarles mucho por escribir a los autores de ciencia ficción!

Los fármacos pueden estar basados en las CDR de los minianticuerpos

Millones de **minianticuerpos** compuestos por un segmento de la región V_H que contiene tres cadenas β y las asas hipervariables H1 y H2 fueron generadas por reordenamiento al azar de los CDR y expresados en la proteína de cubierta pIII del fago. Mediante el enfrentamiento de la genoteca con los sitios de unión del ligando funcionalmente importantes, como los receptores de hormonas, pueden identificarse candidatos principales útiles para los programas de diseño de fármacos y se puede aumentar su afinidad mediante el mejoramiento de las asas, el reordenamiento de éstas y la selección posterior.

Purificación de antígenos y anticuerpos por cromatografía de afinidad

El principio es simple, y su aplicación es *muy* amplia. El antígeno o el anticuerpo está unido a través de sus grupos aminados libres a partículas de Sepharose® activadas con bromuro de cianógeno o a algún otro soporte sólido. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos insolubilizados para extraer el antígeno

Anticuerpo conjugado y empacado en la columna	Pasaje de la mezcla de antígeno a través de la columna de afinidad	Lavado	Eluido	
Sepharose activada + Anticuerpo	Agregado de la mezcla de antígeno	Lavado del antígeno no fijado de la columna	Antígeno específico en el eluido	Purificación del antígeno
Sepharose activada + Antígeno	Agregado de la mezcla de anticuerpo (suero)	Lavado del anticuerpo no fijado de la columna	Anticuerpo específico en el eluido	Purificación del anticuerpo
Antígeno conjugado y empacado en la columna	Pasaje del antisuero a través de la columna de afinidad	Lavado		

Figura 6.6. Purificación por afinidad de antígeno y anticuerpo.

El anticuerpo se inmoviliza en las partículas de Sepharose® activada y utilizada para purificar el antígeno por afinidad. De acuerdo con las condiciones que se emplean para llevar a cabo el ensayo, en este procedimiento también pueden capturarse las proteínas asociadas con el antígeno. Para la purificación de un anticuerpo específico a partir de un antisuero policlonal, el antígeno se inmoviliza en las partículas de Sepharose y los anticuerpos inespecíficos no unidos no son capturados y se eliminan por lavado. Tras la captación, el anticuerpo específico puede eluirse mediante la disminución transitoria del pH o el aumento de la concentración salina de la solución amortiguadora.

correspondiente de la solución, en la que está presente como un componente de una mezcla compleja, por absorción a su superficie. Los residuos que no interesan se eliminan por lavado, y el ligando requerido se libera del absorbente de afinidad mediante la ruptura de los enlaces antígeno-anticuerpo por variaciones en el pH o el agregado de iones caotrópicos como el tiocianato (Figura 6.6). Esta técnica puede utilizarse para identificar el antígeno al que se une un anticuerpo desconocido; es el caso de un autoanticuerpo, por ejemplo. Un enfoque muy semejante también se puede aplicar en la identificación de los **pares de unión** para un antígeno; estas moléculas permanecerán adheridas al antígeno si el procedimiento de inmunopurificación se lleva a cabo en condiciones suaves. Muchas de las proteínas que participan en la señal de traducción del receptor de la célula T, por ejemplo, se identificaron inicialmente mediante el empleo de anticuerpos dirigidos contra componentes conocidos de señalización del TCR con el fin de separar estos componentes de las mezclas proteicas complejas, junto con sus pares de unión. Se demostró que los fragmentos aislados de cadena pesada (V_{HH}) de llama son valiosos durante los ciclos repetidos de purificación del antígeno debido a su resistencia a la desnaturalización por ciclos repetidos de exposición a pH bajo.

Del mismo modo, puede utilizarse un antígeno inmunosorbente para absorber un anticuerpo a partir de una mezcla de la cual es posible purificarlo por elución (Figura 6.6). Esto es especialmente útil en los casos en que un antisuero muestra niveles elevados de reactividad inespecífica contra otros antígenos que lo mantienen inutilizable. La purificación por afinidad de este antisuero, mediante el del antígeno que se utilizó para generarlo, a menudo puede mejorar su especificidad de manera notable.

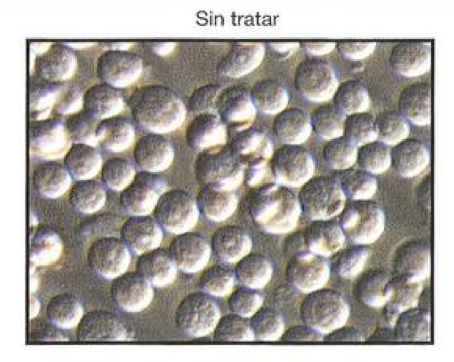
Modulación de la actividad biológica por los anticuerpos

Para detectar anticuerpos

Diversas reacciones biológicas pueden ser inhibidas mediante el agregado del anticuerpo específico. Así, la aglutinación de los eritrocitos por la interacción del virus de influenza con receptores en la superficie del eritrocito puede ser bloqueada por anticuerpos antivirales, y en esto se basa su detección serológica. Una prueba para anticuerpos contra antígenos H de *Salmonella* presentes en los flagelos depende de su capacidad para inhibir la movilidad de las bacterias *in vitro*. Del mismo modo, los anticuerpos contra *Mycoplasma* pueden ser demostrados por su efecto inhibidor sobre el metabolismo de microorganismos en cultivo.

Empleo del anticuerpo como inhibidor

Se describió el tratamiento eficaz de casos de sobredosis de drogas con fragmentos Fab de anticuerpos específicos, y puede convertirse en una propuesta práctica si es posible ensamblar una variedad de hibridomas. Los conjugados de cocaína con la hemocianina de lapa californiana (que se emplea como transportador para inducir la producción eficaz de anticuerpo contra cocaína) pueden generar anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos contra hormonas como la insulina y la tirotropina (TSH) o contra citocinas pueden utilizarse para investigar la especificidad de reacciones biológicas *in vitro*. Por ejemplo, la especificidad de la actividad de tipo insulínico de una muestra de suero sobre la almohadilla adiposa del epidídimo de rata puede ser verificada por el efecto neutralizante de un antisuero. Estos anticuerpos



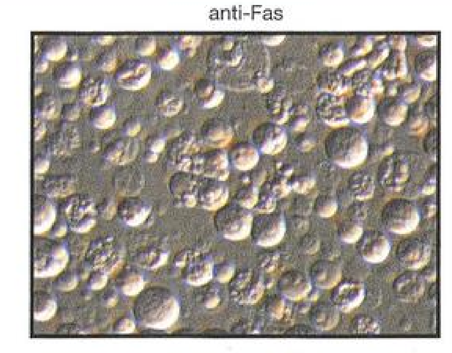
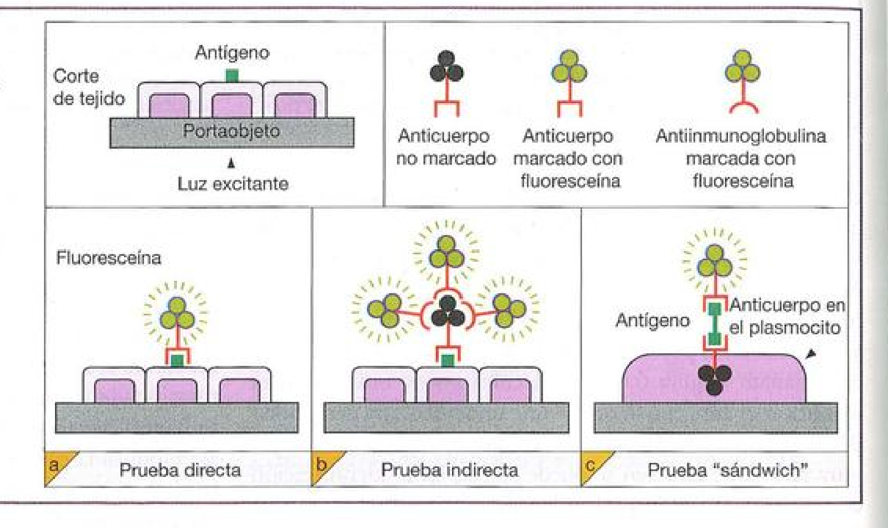


Figura 6.7. Activación del receptor inducida por anticuerpo.

Las células T Jurkat transformadas se dejaron sin tratar o se trataron con anticuerpo IgM anti-Fas durante 4 horas. Los enlaces cruzados del receptor Fas (CD95) con el anticuerpo activa el receptor y da como resultado una cascada de la transducción de la señal que culmina en la activación de una serie de cisteinproteasas, conocidas como caspasas, que provoca la apoptosis en la célula estimulada. Las células apoptósicas muestran la formación de estructuras similares a ampollas de la membrana citoplasmática y el colapso de la célula en fragmentos pequeños o vesículas denominados "cuerpos apoptósicos". Efectos similares también se observan cuando el ligando natural, FasL, se utiliza en lugar del anticuerpo anti-Fas. (Cortesía de Colin Adrain, Departamento de Genética, Trinty College, Dublín, Irlanda.)

Figura 6.8. Base de las pruebas de fluorescencia con anticuerpos para la identificación de antígenos tisulares o sus anticuerpos.

● = fluoresceína marcada.



quizá sean eficaces *in vivo*, y el tratamiento con anti-TNF de pacientes afectados de artritis reumatoidea confirmó el papel de esa citocina en el proceso mórbido. Asimismo, como parte de los esfuerzos mundiales para prevenir la desastrosa superpoblación, están en marcha intentos de inmunización contra gonadotrofina coriónica mediante el empleo de fragmentos de la cadena β acoplados a transportadores apropiados, ya que esta hormona es necesaria para mantener el óvulo implantado.

En un contexto totalmente diferente, los anticuerpos elaborados contra las proteínas inhibidoras del crecimiento de los axones de las neuronas (neuritas) asociadas a la mielina revelaron su importancia en la prevención de la reparación del nervio, en el que el tratamiento con esos anticuerpos permitió la regeneración de los axones corticoespinales después de una lesión inducida de la médula espinal en ratas adultas. Este hallazgo bastante notable llevó a un avance significativo en nuestra comprensión de los procesos que participan en la regeneración y sentó las bases para un cauto optimismo en lo que se refiere al desarrollo del tratamiento de las lesiones de la médula espinal, si bien por diversos motivos éste no puede basarse en la terapéutica con anticuerpos.

Empleo del anticuerpo como activador

Los anticuerpos también pueden usarse para sustituir ligandos biológicos naturales, sea porque se desconoce el ligando o porque purificarlo es difícil o muy costoso. Por ejemplo, los anticuerpos pueden usarse en lugar del ligando para estimular receptores de la superficie celular que propagan señales en la célula por entrecruzamientos. Normalmente, el ligando natural para el receptor podría promover la formación de enlaces cruzados con el receptor, pero los anticuerpos pueden utilizarse para simular esto de manera muy eficaz. Este enfoque se ha utilizado con gran efecto para estudiar los acontecimientos intracelulares que tienen lugar en la estimulación de complejos del receptor con células B o células T por anticuerpos dirigidos contra esos receptores o proteínas asociadas (como el complejo CD3). En una línea similar, los anticuerpos dirigi-

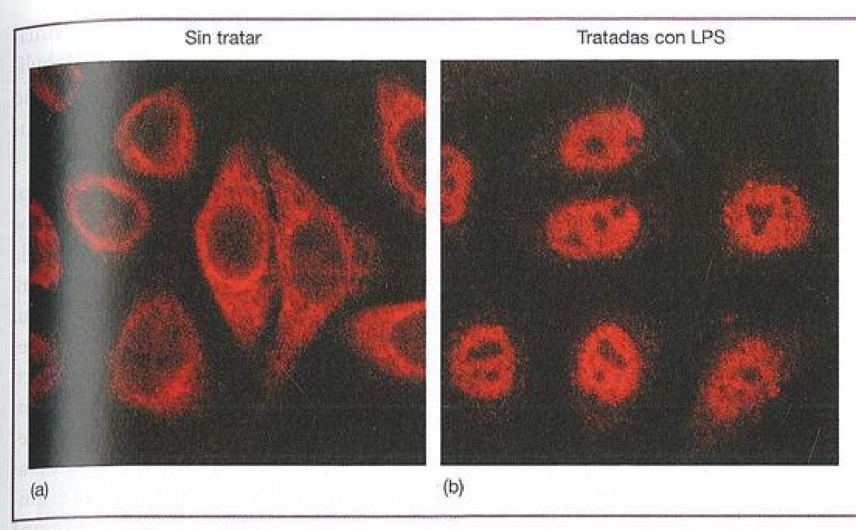


Figura 6.9. Inmunolocalización de un factor de transcripción tras la estimulación del receptor.

Los monocitos humanos transformados (células THP-1) se dejaron sin tratar a) o se estimularon con el lipopolisacárido bacteriano (LPS) durante 2 horas b). Las células se sometieron después a la fijación y la inmunotinción con un anticuerpo anti-NFκB. Obsérvese que en las células sin estimular la presencia de NFκB es abundante en el citoplasma celular pero está excluido del núcleo, mientras que ocurre a la inversa en las células estimuladas con LPS. (Cortesía de Lisa Bouchier-Hayes, St. Jude's Hospital, Memphis, Estados Unidos.)

dos contra el receptor de la superficie celular Fas (CD95) pueden sustituir el ligando natural (FasL/CD95L) para estimular el receptor y estudiar las consecuencias que produce. En este último caso, la estimulación de Fas por los anticuerpos anti-Fas induce la muerte celular programada (apoptosis) rápida en las células que tienen el receptor (Figura 6.7). Otro buen ejemplo es la inducción de la liberación de histamina proveniente de los mastocitos por el $F(ab')_2$ divalente anti-FcεRI, pero no por el fragmento univalente. La activación inducida por anticuerpo se puede aplicar al estudio de la progresión de la cascada de transducción de la señal de la ocupación del receptor por el ligando, incluso cuando el ligando no se ha identificado todavía.

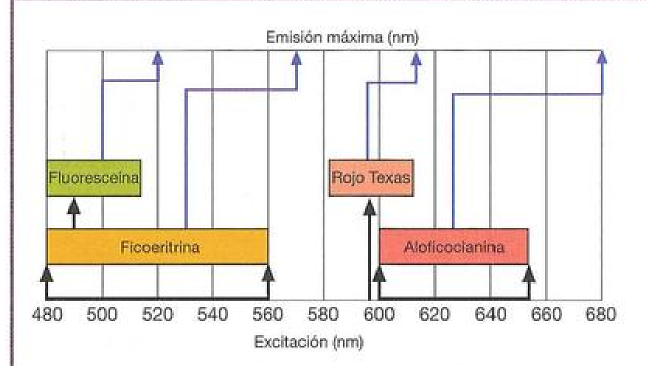


Figura 6.10. Marcadores fluorescentes utilizados en la microscopia de inmunofluorescencia y la citometría de flujo.

La onda de emisión más larga de la fluoresceína se superpone con la del rojo Texas y es corregida por el programa informático. Las ficobiliproteínas de las algas rojas y las cianobacterias efectúan la transferencia de energía de la luz azul a la clorofila para la fotosíntesis; cada molécula tiene muchos grupos fluorescentes que permiten un amplio espectro de excitación, pero se emite la fluorescencia dentro de una banda de la longitud de onda estrecha con una eficacia cuántica tan alta como para obviar la necesidad de un segundo anticuerpo amplificador.

Inmunodetección de antígeno en las células y en los tejidos

Microscopio de inmunofluorescencia

Los anticuerpos pueden ser usados como sondas muy sensibles para explorar la localización subcelular de una proteína (u otro determinante antigénico) dentro de una célula o un tejido. Dado que los colorantes fluorescentes, como fluoresceína y rodamina, pueden acoplarse a anticuerpos sin destruir su especificidad, los conjugados se pueden combinar con el antígeno presente en un corte de tejido y visualizar mediante un microscopio equipado con una fuente luz adecuada (de modo característico, UV). Desde otro punto de vista, también es posible utilizar el método para la detección de anticuerpos dirigidos contra antígenos conocidos que están presentes en un corte de tejido dado o en un preparado celular. Antes de aplicar el anticuerpo a la célula o al tejido, las muestras requieren fijación y permeabilización con el objetivo de conservar las estructuras celulares y permitir el libre paso del anticuerpo a través de la membrana citoplasmática. Hay dos maneras generales de llevar a cabo la prueba.

Prueba directa con anticuerpos marcados

El anticuerpo contra el antígeno tisular se conjuga directamente con el fluorocromo y se aplica a la muestra (Figura 6.8a). La unión del anticuerpo con el antígeno se manifiesta por la parte de la célula que se torna fluorescente cuando se la ilumina con luz UV. Por ejemplo, supongamos que se desea mostrar la distribución de un autoantígeno tiroideo que reacciona con los autoanticuerpos presentes en el suero de un paciente con enfermedad de Hashimoto, una forma de autoinmunidad tiroidea. Se aislaría IgG a partir del suero del paciente, se la conjugaría con fluoresceína y se la aplicaría a un corte de glándula tiroides humana en un portaobjetos. Con el microscopio de fluorescencia, se vería que el citoplasma de las células epiteliales foliculares tendría una tinción brillante (véase la Figura 18.1a).

Consideremos otro ejemplo para ilustrar la versatilidad de esta técnica. Ya hemos generado un anticuerpo monoclonal contra un factor de transcripción (NFκB, por ejemplo), que se sabe es importante para la activación del macrófago inducido por LPS y la producción de IL-1β. Podríamos comparar los

macrófagos en reposo con los tratados con LPS para determinar si el factor de transcripción hace algo "interesante" en la exposición de macrófagos al LPS. Recuérdese del Capítulo 1 (véase la Figura 1.9) que el NFκB está en el citoplasma y se evita que ingrese en el núcleo como resultado de la interacción con su inhibidor, IκB. Tras la estimulación del receptor TLR4 con el LPS, se pone en movimiento una cadena de acontecimientos de transducción de la señal que culmina en la degradación del IκB que deja libre el NFκB para translocarse al núcleo e iniciar la transcripción génica (véase la Figura 1.9). Así, si se utilizara un anticuerpo contra el NFκB, observaríamos que mientras que los macrófagos en reposo contienen muchos NFκB todos parecen estar en el citoplasma. Sin embargo, también advertiríamos que en el transcurso de algunos minutos de exposición al LPS prácticamente todos los NFκB se desplazan hacia el núcleo (Figura 6.9).

Si se utilizan dos (o incluso tres) antisueros conjugados con colorantes que emiten fluorescencia de diferente longitud de onda, varios antígenos pueden identificarse simultáneamente en la misma preparación. En la Figura 2.7e, la tinción directa de plasmocitos fijados con una mezcla de anti-IgG marcada con rodamina y anti-IgM conjugada con fluoresceína demuestra que estas dos clases de anticuerpos son producidas por células diferentes. A menudo, se emplea la técnica de acoplamiento de biotina al antisuero y la tinción final con avidina fluorescente.

Prueba indirecta para anticuerpos

En esta técnica en doble capa, que es el enfoque adoptado con mayor frecuencia, el anticuerpo no marcado (el anticuerpo principal) se aplica directamente sobre el tejido y se visualiza mediante el tratamiento con un suero antiinmunoglobulina (el anticuerpo secundario) conjugado con fluorocromo (Figura 6.8b). Hay gran disponibilidad de antisueros antiinmunoglobulina conjugados con fluorocromos diferentes.

Esta técnica ofrece varias ventajas. En primer lugar, la fluorescencia es más brillante que con la prueba directa, ya que diversas antiinmunoglobulinas fluorescentes se unen con cada una de las moléculas de anticuerpo presentes en la primera capa (Figura 6.8b). En segundo lugar, incluso cuando deban evaluarse muchos sueros para anticuerpos específicos, sólo es necesario preparar (o, con más frecuencia, comprar) un único anticuerpo secundario. Además, el método tiene gran flexibilidad. Por ejemplo, mediante el uso de conjugados de antisueros contra diferentes antígenos en estudio es posible comparar las posiciones relativas o la expresión de dos antígenos distintos dentro de la misma célula. Sin embargo, en esta última situación los anticuerpos principales pueden no haberse generado en las mismas especies o el reactivo secundario no puede discriminar entre ellos. Por ejemplo, para marcar al mismo tiempo citocromo *c* y tubulina en una célula, se necesitaría utilizar anticuerpo antitubulina producido en ratón, en combinación con anticuerpo anticitocromo *c* producido en conejo, o a la inversa. Mediante el empleo de reactivos para la detección secundaria, específicos de especie (es decir, Ig antirratón y anticonejo) que se marcan con fluorocromos diferentes, es una cuestión simple detectar ambas proteínas dentro de la misma célula (Figura 6.11).

En el Capítulo 18 se describen otras aplicaciones de las pruebas indirectas.

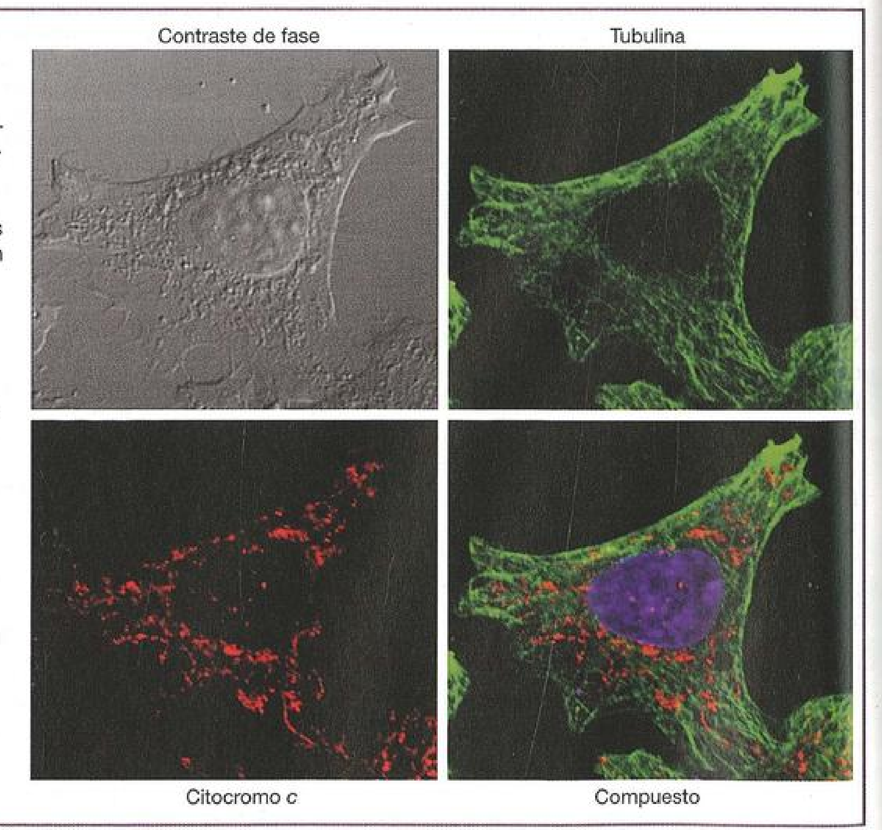


Figura 6.11. Microscopia de inmunofluorescencia confocal.

Célula HeLa humana inmunoteñida con anticuerpo anti-b-tubulina de ratón detectada con anticuerpo anti-Ig de ratón marcado con FITC *(verde)* y anticuerpo de conejo anticitocromo *c* detectado con anti-Ig de conejo marcado con rojo Texas *(rojo)*. Las células también se tiñeron con el colorante de unión al DNA, DAPI *(azul)*. Como comparación, también se muestra una imagen de contraste de fase de la misma célula. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal Olympus Flouroview 1000. (Cortesía de la Dra. Petrina Delivani, Departamento de Genética, Trinity College Dublin, Irlanda.)

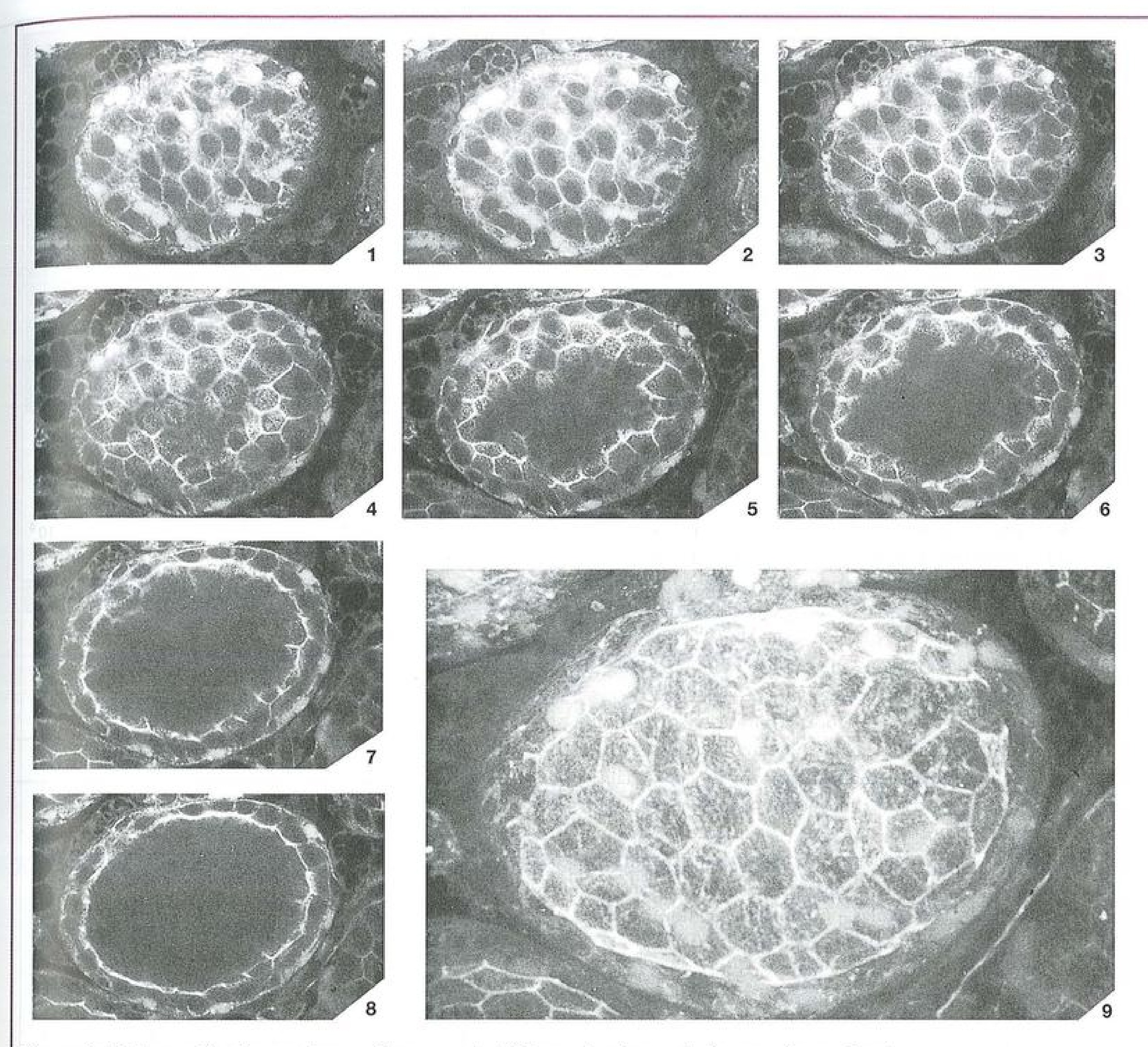


Figura 6.12. Formación de una imagen fluorescente tridimensional con el microscopio confocal.

Un folículo tiroideo esférico en un corte grueso de la glándula tiroides de rata fijado con formol se tiñó con un conjugado de rodamina-faloidina que se une a la actina F (resultados similares a los obtenidos con los conjugados de anticuerpos). Si bien la muestra era muy gruesa, el microscopio se enfocó en planos sucesivos con intervalos de 1 mm desde la parte superior del folículo (imagen N° 1) hasta su parte media (imagen N° 8); el total de las imágenes representa un hemisferio. Obsérvese cómo la fluorescencia en un plano no interfiere con la de los otros y que la fotografía compuesta (imagen N° 9) de las imágenes 1-8 muestra la totalidad de la tinción fluorescente en foco en toda la profundidad del hemisferio. Es claro que el anticuerpo tiñe las construcciones hexagonales cercanas a la superficie apical (interna) de las células epiteliales foliculares. Los eritrocitos se observan cerca de la parte superior del folículo. (Los negativos de las fotografías fueron gentilmente proporcionados por Anna Smallcombe, tomados por el personal de Bio-Rad en un sistema de formación de imágenes confocal Bio Rad MRC- 600 que utiliza material proporcionado por el profesor V. Herzog y Fr. Brix de la Universidad de Bonn.)

Microscopio confocal

Las imágenes fluorescentes con gran aumento suelen ser difíciles de resolver a causa del brillo ligeramente fuera de foco por encima y por debajo del objeto. Las imágenes borrosas suelen ser de poca ayuda para investigar los puntos más finos de la arquitectura celular. Ahora, todo esto es cuestión del pasado con el advenimiento y la comercialización de **microscopios confocales de barrido** que centran la fuente de luz de un rayo láser en un plano delgado dentro de la célula y recogen la emisión de fluorescencia en un tubo fotomultiplicador *(photo-multiplier tube - PMT)* con una abertura confocal. La fluorescencia proveniente de planos situados ubicados por encima y por debajo del plano del objeto no llega al PMT y por eso la definición de la imagen está muy incrementada en relación con la del microscopio de inmunofluorescencia convencional (Figura 6.11). Una unidad de barrido X-Y permite el estudio *cuantitativo* de la totalidad del plano de la muestra, y con la óptica conveniente, pueden utilizarse al mismo tiempo tres o cuatro fluorocromos diferentes. El programa infor-

mático del instrumento puede computar imágenes fluorescentes tridimensionales de una serie automática de estos barridos X-Y acumuladas en el eje Z (Figura 6.12) y rotarlas según el gusto del operador. Estas pilas Z pueden usarse para reconstruir una imagen tridimensional de una célula, tejido u orgánulo, y ofrecer visiones incomparables en la célula y la estructura molecular. También pueden llevarse a cabo experimentos en intervalos regulares mediante el empleo del microscopio confocal, y esto a menudo transforma nuestra comprensión de los acontecimientos vistos previamente como fotografías instantáneas en una secuencia temporal. ¡Hay que verlo para creerlo!

Citometría de flujo

Cuando una población celular es sujeta a inmunotinción para un marcador particular (p. ej., CD4), un subgrupo de la población puede expresar este marcador en concentraciones elevadas, otro conjunto diferente puede expresar el mismo marcador en concentraciones bajas y el resto puede ser negativo. Para agregar mayor complejidad, se puede desear el examen simultáneo de la expresión de un marcador diferente (p. ej., CD8) para determinar si la expresión de estas proteínas es mutuamente excluyente. La evaluación del porcentaje de células en una población que expresa CD4 o CD8, o ambos, sería una tarea ardua mediante el empleo de microscopia de fluorescencia o microscopia confocal, ya que implicaría el recuento manual de varios cientos de células para obtener cifras confiables. Además de la tarea, estos análisis también serían bastante subjetivos y muy variables de acuerdo con la pericia del operador. Afortunadamente, el **citómetro de flujo** realiza estas determinaciones en forma sencilla, ya que este instrumento puede analizar el grado de fluorescencia asociado con miles de células por minuto de una manera sumamente reproducible y cuantitativa (Figura 6.13).

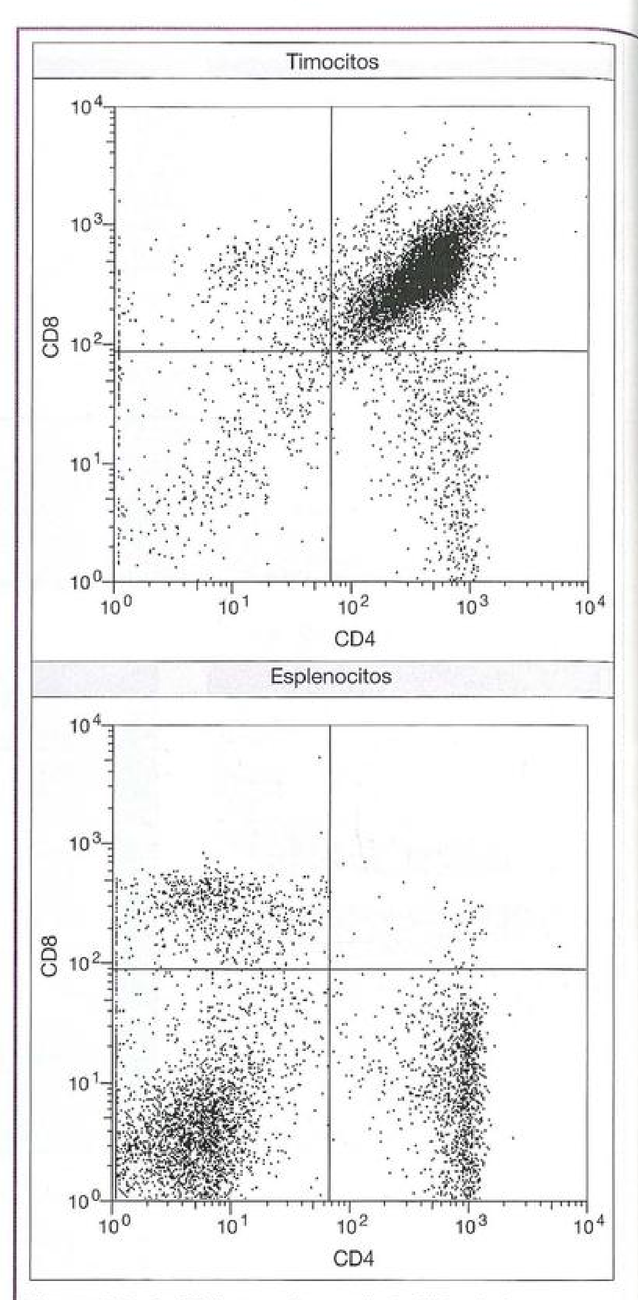


Figura 6.13. Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD4 y CD8 en timocitos y esplenocitos.

Los timocitos y los esplenocitos de ratón se tiñeron con anticuerpos anti-CD4 conjugados con FITC y anti-CD8 conjugados con rodamina. Se aprecia que casi todos los timocitos son positivos para CD4 y CD8 y por consiguiente están presentes en el cuadrante superior derecho; también se detectan timocitos positivos sólo para CD4 (inferior derecho) o CD8 (superior izquierdo) y células doble negativas (inferior izquierdo). En el bazo se encuentran escasas células doble positivas, la mayoría (con más probabilidad células B) son negativas para CD4 o CD8 y se acompañan de células positivas para uno de los marcadores. (Cortesía del profesor Thomas Brunner y de Daniela Kassahn.)

En su forma más básica, el citómetro de flujo es un instrumento equipado con un sistema de manejo del líquido capaz de mover miles de células en una **sola fila** a través de una cámara estrecha iluminada por un láser. El paso de una célula inmunomarcada a través de la cámara (denominada **célula de flujo**) produce la excitación del fluorocromo adherido a la célula por el láser. La emisión resultante del fluorocromo se evalúa mediante un detector basado en un fotomultiplicador, que permite la cuantificación precisa de la fluorescencia asociada con la célula. Así, es posible diferenciar con rapidez células negativas, ligeramente positivas o muy positivas para un marcador o un antígeno dado. Los citómetros de flujo más modernos están provistos con tres o cuatro láseres de longitudes de onda diferentes (junto con detectores asociados) y cada combinación láser-detector puede recoger señales de los distintos fluorocromos diferentes (Figura 6.14). Como resultado, es posible realizar la inmunotinción de una población celular para cuatro marcadores diferentes (con un anticuerpo marcado con un fluorocromo diferente usado para cada uno) y recoger datos que se relacionan con la expresión de la totalidad de los cuatro marcadores a medida que la célula pasa a través del citómetro de flujo.

Las buenas noticias no terminan allí: el citómetro de flujo también es capaz de proporcionar información relativa al **tamaño** y la **granularidad** (densidad de orgánulos) de la célula por la manera en que la luz del láser se dispersa o se refleja a medida que atraviesa la célula. Esta información (denominada dispersión frontal y lateral) también es muy útil, ya que suele ser suficiente para permitir la discriminación entre tipos celulares distintos (Figura 6.15a).

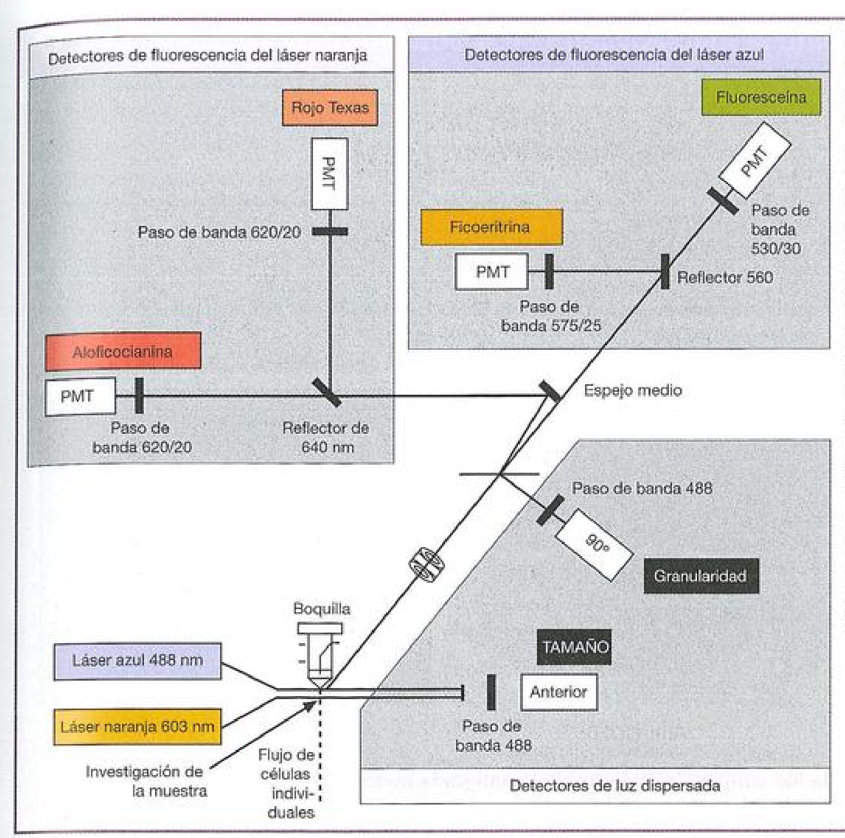


Figura 6.14. Sistema óptico de citometría de flujo con seis parámetros para el análisis de la inmunofluorescencia multicolor.

La fluorescencia celular excitada por el láser azul se divide en señales verdes (fluoresceína) y anaranjadas (ficoeritrina), mientras que la fluorescencia excitada por el láser anaranjado es reflejada por un espejo y se divide en señales casi rojas (rojo Texas) y rojas (aloficocianina). En este sistema también se mide la luz azul dispersada en pequeños ángulos frontales y a 90°, lo cual proporciona información sobre el tamaño celular y la granularidad interna, respectivamente. PMT, tubo fotomultiplicador. (Basado en Hardy R.R. [1998]. En Delves P.J. y Roitt I.M. [eds] *Encyclopedia of Immunology*, 2 ed., p. 946. Academic Press, Londres.) ¡El uso reciente de tres rayos láser y nueve fluorocromos distintos amplía incluso más el sistema, lo cual proporciona 11 parámetros!

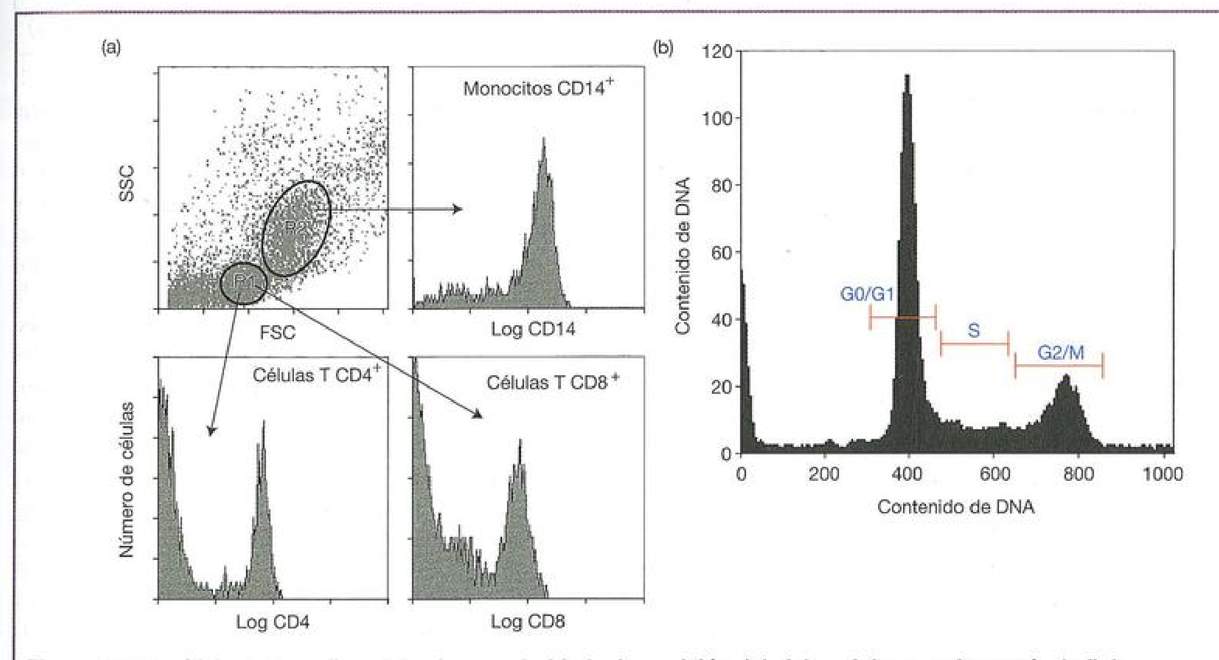


Figura 6.15. Análisis del tamaño celular, la granularidad y la posición del ciclo celular por citometría de flujo.

a) Tinción de sangre periférica con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD14, seguida por el análisis de células según las características de la dispersión frontal (FSC) y lateral (SSC) (superior izquierda). Las células con características de dispersión frontal y lateral baja (linfocitos, R1) se analizaron para la expresión de CD4 o CD8, según corresponda. Las células con características de dispersión frontal y lateral alta (monocitos, R2) se analizaron para la expresión de CD14. (Los datos fueron gentilmente proporcionados por el profesor Thomas Brunner.) b) Análisis del ciclo celular de células T de Jurkat transformadas por tinción con yoduro de propidio. El colorante fluorescente que se une al DNA, yoduro de propidio, tiñe las células en proporción con su contenido de DNA; las células con contenido diploide normal (2N) de DNA aparecen en la fase G0/G1 del ciclo celular, las células que sintetizan DNA activamente tienen un contenido mayor de 2N de DNA y por consiguiente se asignan a la fase S, mientras que las células con contenido 4N (diploide) de DNA está en G2 o mitosis (G2/M). (Cortesía de Colin Adrain, Trnity College Dublin, Irlanda.)

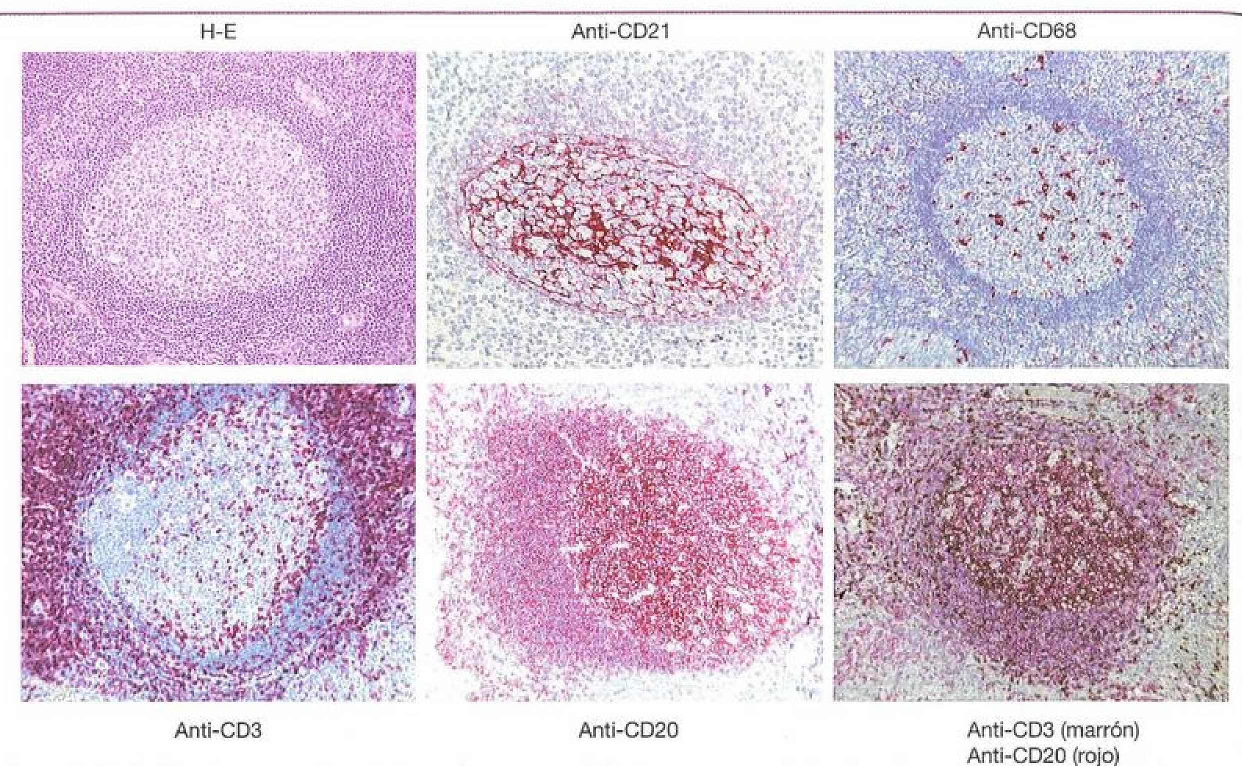


Figura 6.16. Análisis inmunohistoquímico de los centros foliculares de la amígdala humana.

Los preparados de amígdala humana se tiñeron con la técnica histoquímica de hematoxilina y eosina (H-E) o con técnica de inmunotinción con anticuerpos contra CD21 (receptor de complemento 2, expresado en las células dendríticas foliculares y células B), CD68 (expresado en los macrófagos), CD3 (células T), CD20 (células B), o una combinación de anti-CD3 y anti-CD20, como se muestra. (Las imágenes fueron gentilmente proporcionadas por el Dr. Andreas Kappeler, Universidad de Berna, Suiza.)

Así, el citómetro de flujo registra datos cuantitativos referentes al contenido de antígeno y la naturaleza física de cada célula, con parámetros múltiples que se evalúan célula por célula para brindar un análisis fenotípico de cada una en lugar de un promedio de la población. Con el número asombroso de anticuerpos monoclonales y los fluorocromos disponibles, en la actualidad es posible proceder al análisis con alto grado de detalle, lo cual representa una contribución notable al diagnóstico de la leucemia.

También se puede investigar el *interior* de la célula de varias maneras. La permeabilización para permitir la penetración de los anticuerpos fluorescentes (de preferencia con Fab pequeño o incluso fragmentos de cadena simple Fv) proporciona una lectura de citocinas y otras proteínas intracelulares. El análisis del ciclo celular se logra con un colorante unido al DNA, como yoduro de propidio, para medir el contenido de DNA (Figura 6.15b) y la detección de anticuerpos por incorporación de BrdU con el fin de visualizar la síntesis de DNA. Además, se han desarrollado sondas fluorescentes para determinar el pH, la concentración de tiol, Ca^{2+}, Mg^{2+} y Na^{+} intracelulares.

Otros métodos con anticuerpos marcados

Un problema con los conjugados fluorescentes es que las señales emitidas por estas sondas se desvanecen en el transcurso de un tiempo relativamente corto; también puede producirse el fotoblanqueado de la marca fluorescente con la exposición a una fuente de excitación (como la luz UV). En la práctica, éste no es un problema siempre que la muestra marcada se analice de un modo oportuno. Sin embargo, enzimas como la fosfatasa alcalina (véase la Figura 1.10d) o la peroxidasa del rábano pueden acoplarse a anticuerpos y luego visualizarse con métodos histoquímicos convencionales mediante microscopia óptica (Figura 6.16). Estas tinciones son relativamente estables y resultan muy útiles para la tinción de cortes de tejido en lugar de suspensiones celulares.

También se utiliza mucho en microscopia electrónica el oro coloidal unido a anticuerpos como un inmunomarcador electrodenso. Pueden aplicarse al menos tres anticuerpos diferentes en el mismo corte mediante la marcación con partículas de oro de tamaños diferentes (véase la Figura 8.16). Una nueva sonda ultrapequeña formada por fragmentos Fab' unidos a cúmulos undecaaúricos permite una localización espacial más precisa de los antígenos y su tamaño pequeño hace posible marcar sitios que son inaccesibles a los inmunomarcadores de mayor tamaño. Sin embargo, la visualización clara requiere un microscopio electrónico de transmisión con barrido de alta resolución.

Detección y cuantificación de antígenos por anticuerpos

Inmunoensayo de antígenos por ELISA

La capacidad de establecer la concentración de un analito (es decir, una sustancia que debe ser determinada) a través de la ocupación fraccional de su reactivo de unión específi-

Avances y descubrimientos 6.1—Ensayos para la unión a ligandos

La observación de que un ligando podía determinarse por ocupación fraccional *(F)* de su agente de unión específico impulsó una nueva categoría de ensayos sensibles de amplia aplicación. Los análisis que utilizan unión a ligandos fueron introducidos por primera vez para la determinación de la hormona tiroidea por la proteína de unión a la tiroxina (Ekins) y para la evaluación de hormonas por anticuerpos (Berson y Yalow). Estos hallazgos dieron como resultado la tecnología de radioinmunoensayo, denominada así porque los antígenos tenían que marcarse de alguna manera y los candidatos más convenientes para ello eran los radioisótopos.

La relación entre la ocupación fraccional y la concentración de analito [A] está dada por la ecuación:

$$F = 1 - (1/1 + K[An])$$

donde K es la constante de asociación de la reacción de unión al ligando. F puede ser determinada por ensayos no competitivos o competitivos (Figura A6.1.1) y relacionarse con la curva de calibración construida con cantidades estándares de analito.

En el caso de los ensayos competitivos, la sensibilidad teórica máxima está dada por el término e/K donde e es el error experimental (coeficiente de variación). Si suponemos que el error es del 1% y K es 10^{11} M^{-1}, las sensibilidades máximas serán $0{,}01 \times 10^{-11}$ M = 10^{-13} M o 6×10^{7} moléculas/mL. Para ensayos no competitivos, los marcadores de muy alta actividad específica podrían dar sensibilidades menores de 10^{2}–10^{3} moléculas/mL en condiciones ideales. En la práctica, sin embargo, dado que la sensibilidad representa la menor concentración del analito que puede medirse contra un nivel de base que contiene cero analito, el error de la determinación del nivel de base impone una restricción esencial en la sensibilidad.

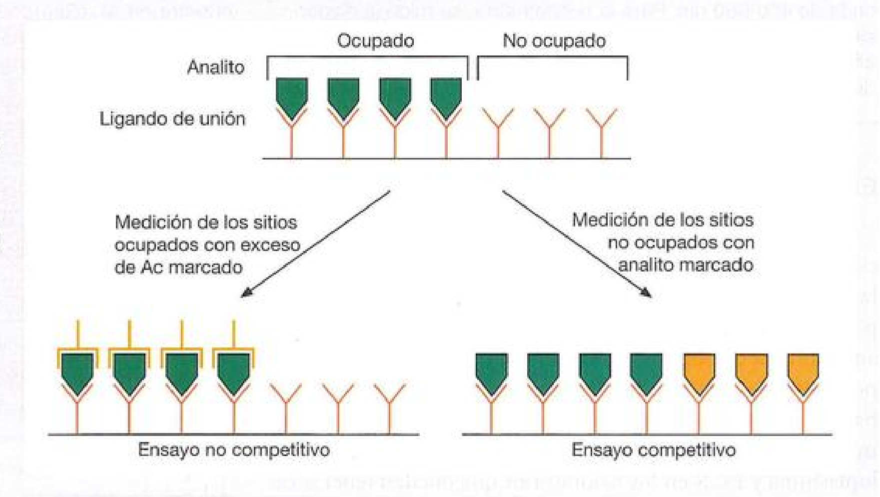


Figura A6.1.1. Principio de los ensayos de unión a ligandos. El agente de unión a ligandos puede estar en la fase soluble o unido a un soporte sólido como se muestra aquí; la ventaja de éste radica en la facilidad de la separación del analito unido del libre. Después de la exposición al analito, la ocupación fraccional de los sitios de unión al ligando puede determinarse mediante ensayos competitivos o no competitivos con reactivos marcados *(en naranja)* como se muestra. Ac, anticuerpo.

co es una característica de todos los sistemas de unión a ligando (Avances y descubrimientos 6.1), pero debido a que los anticuerpos pueden elevarse prácticamente frente a cualquier estructura, su aplicación es más versátil en el inmunoensayo.

Los analitos de gran tamaño, como las hormonas proteicas, comúnmente se estiman por un ensayo no competitivo de dos sitios, en el que el fijador del ligando original y el reactivo de detección marcado son ambos anticuerpos (Figura A6.1.1). Mediante el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos a dos epítopos diferentes en el mismo analito, el sistema tiene mayor poder para discriminar entre dos analitos relacionados; si la reactividad cruzada fraccional del primer anticuerpo para un analito relacionado es de 0,1 y la del segundo también es de 0,1, la lectura definitiva para la reactividad cruzada será tan baja como 0,1 × 0,1, es decir, 1%. Si se utilizan sondas quimioluminiscentes y fluorescentes con resolución en función del tiempo, se dispone de ensayos altamente sensibles para una diversidad asombrosa de analitos. En el caso de las moléculas de pequeño tamaño como los fármacos u hormonas esteroides, donde es impracticable la unión en dos sitios, son apropiados los ensayos competitivos (Figura A6.1.1).

La técnica **ELISA** (**ensayo inmunosorbente ligado a enzimas**) es una de las más comunes para la determinación de antígenos, como citocinas, a partir de suero o líquido de cultivo celular. La técnica es bastante sencilla e implica la inmovilización del anticuerpo a la proteína de interés dentro de los pocillos plásticos de una placa de microtitulación. A continuación, se bloquean los sitios de unión a la proteína no fijados dentro de la placa mediante la incubación con una proteína irrelevante como la albúmina. A los pocillos recubiertos por anticuerpo se les agregan las muestras que contienen el antígeno de interés y las placas se incuban durante un par de horas para permitir la *captura* del antígeno por el anticuerpo. Tras el lavado para eliminar el material no unido, se *detecta* el antígeno unido mediante el agregado de un segundo anticuerpo dirigido contra un sitio de unión diferente sobre el antígeno al reconocido por el anticuerpo de la captura. El antígeno ahora está intercalado entre los dos anticuerpos que dan lugar a las denominaciones de "**sándwich ELISA**" o **ensayo de captura de antígeno**. El anticuerpo que se emplea para la detección se conjuga con una enzima como peroxidasa de rábano o fosfata alcalina que, con el agregado del sustrato de la enzima, da origen a un producto coloreado o una reacción quimioluminiscente. La comparación entre un rango de estándares de concentración conocida permite calcular la concentración del antígeno en las muestras de prueba.

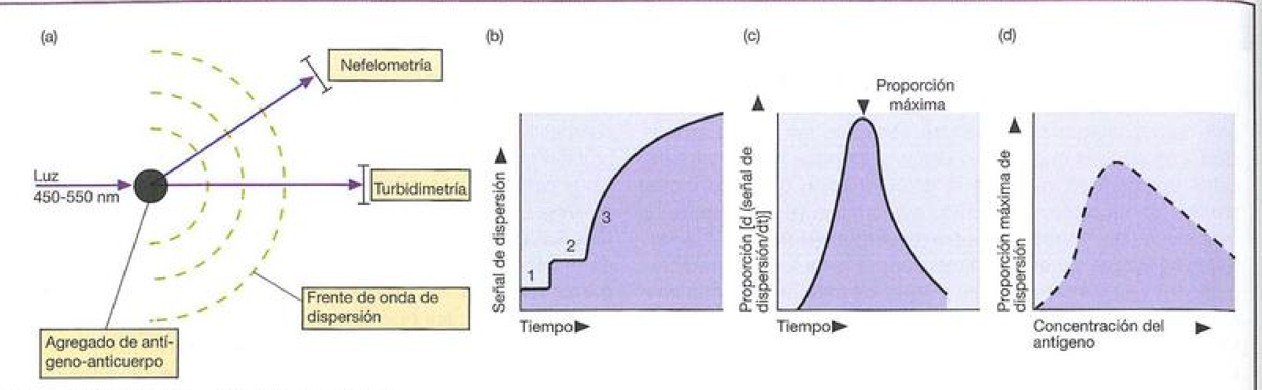


Figura 6.17. Nefelometría proporcional.

a) Cuando se añade el antisuero, se forman pequeños agregados de antígeno-anticuerpo (véase la Figura 6.24) que dispersan la luz incidente filtrada y dan una banda de longitud de onda de 450-550 nm. Para la nefelometría, se mide la dispersión de la luz en un ángulo aproximado de 70°. b) Después de añadir la muestra (1) y el anticuerpo (2), se determina la tasa de formación del agregado (3) a partir de la señal de dispersión. c) Un programa computarizado *(software)* en el instrumento calcula luego la tasa máxima de dispersión de la luz que se relaciona con la concentración del antígeno como se muestra en d). (Reproducido del manual de instrucción del inmunonefelómetro automatizado para la reacción de proporción "Array", con autorización de Beckman Coulter Ltd.)

Ensayo nefelométrico para antígenos

Si el antígeno se agrega a una solución con exceso de anticuerpos, la cantidad de complejos que pueden evaluarse por la dispersión frontal de la luz en un nefelómetro (véase p. 164) se relaciona de manera lineal con la concentración de antígeno. La disponibilidad de una gama amplia de anticuerpos monoclonales que facilita la estandarización del método hace que la nefelometría se utilice con frecuencia para la estimación de inmunoglobulinas, C3, C4, haptoglobina, ceruloplasmina y PCR en los laboratorios que pueden tener acceso al equipo apropiado. Se pueden analizar muestras de volumen muy pequeño, en el orden de 1-10 μL. La turbidez de la muestra puede constituir un problema; los valores de los testigos carentes de anticuerpos se pueden deducir de la muestra, pero una solución más satisfactoria es seguir la **tasa de formación** de complejos que es proporcional a la concentración del antígeno, ya que esto obvia la necesidad de un testigo separado (Figura 6.17). Debido a que los complejos solubles comienzan a formarse en exceso de antígeno, es importante asegurarse de que el valor del antígeno se obtuvo en un exceso de anticuerpo mediante el análisis de un control adicional en el cual se incluye más antígeno.

Inmunoelectrotransferencia (Western blot)

Esta técnica, ampliamente adoptada, puede usarse para determinar la **masa molecular relativa** de una proteína y explorar su comportamiento dentro de una mezcla compleja de proteínas. Por el análisis de inmunoelectrotransferencia, puede determinarse si la proteína de interés está regulada de modo positivo, de modo negativo, escindida, fosforilada, glucosilada o ubicuitinada en respuesta a un estímulo particular. Esto implica, en primer lugar, la separación de una mezcla de proteínas a través de una matriz de gel que se forma por la polimerización de acrilamida y bisacrilamida entre un par de placas de vidrio. La **electroforesis en gel de poliacrilamida** (*polyacrilamide gel electrophoresis;* **PAGE**) de las proteínas se realiza habitualmente utilizando mezclas proteicas que fueron desnaturalizadas por calentamiento en presencia de un detergente, el dodecilsulfato de sodio (SDS). Ésta es una molécula con carga negativa acoplada de modo covalente a las proteínas a lo largo de su longitud cuando se expone al calor; aparte de desnaturalizar la proteína, este procedimiento también imparte una carga negativa en proporción con su longitud. Después de la introducción de la muestra de proteína al gel y de la aplicación de un campo eléctrico vertical desde la parte superior a la inferior del gel, las proteínas son repelidas del polo negativo (cátodo) y migran hacia el polo positivo (ánodo). Debido al efecto de tamizado molecular de la matriz del gel, las proteínas dentro de la mezcla se resuelven en zonas separadas (bandas); las proteínas más pequeñas son las que migran más lejos a través del gel (Figura 6.18).

Con el objeto de identificar la proteína de interés en la mezcla proteica separada por electroforesis se utilizan anticuerpos, para lo cual permitir su acceso a las proteínas dentro del gel. Dado que los anticuerpos son proteínas relativamente grandes, no pueden atravesar la matriz del gel con facilidad; la solución a este problema es "transferir" el gel sobre una membrana con carga positiva para que atrape las proteínas cargadas y las inmovilice en su superficie (Figura 6.18). Esto se logra mediante la aplicación de otro campo eléctrico para dirigir las proteínas de modo horizontal hacia la parte externa del gel sobre la membrana en la que se realizó la transferencia; las membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) y nitrocelulosa son las utilizadas para este propósito. La transferencia puede demostrarse entonces con sondas de anticuerpos policlonales o monoclonales dirigidos contra la proteína de interés. La unión del anticuerpo se detecta empleando anticuerpos secundarios anti-Ig conjugados con peroxidasa de rábano, seguido de la aplicación de un sustrato adecuado para la enzima (Figura 6.19).

Es obvio que el procedimiento no funciona con antígenos que sufren desnaturalización irreversible por este detergen-

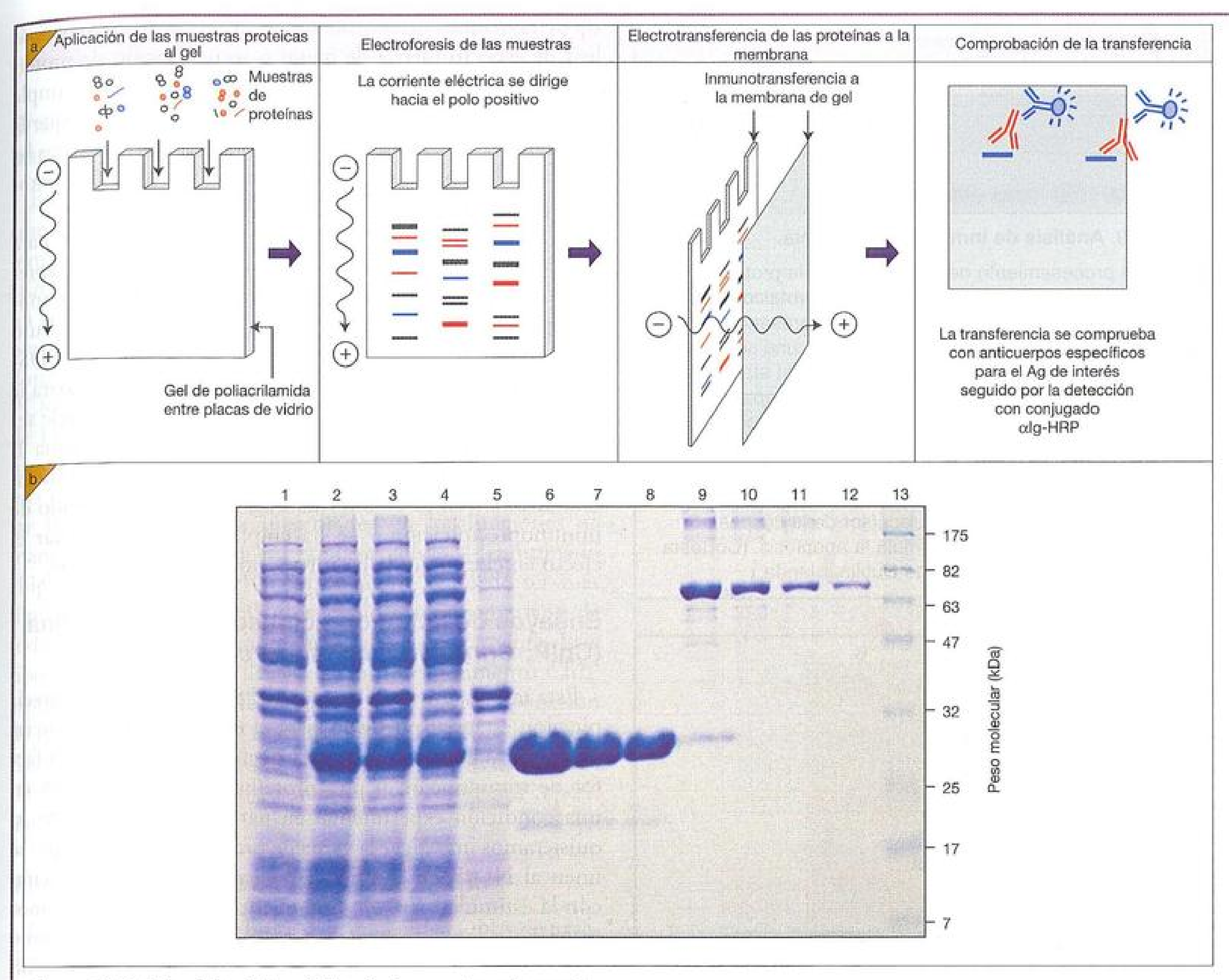


Figura 6.18. Principio del análisis de inmunotransferencia.

a) Las mezclas proteicas desnaturalizadas pueden separarse sobre la base de sus movilidades relativas a través de una matriz de gel que se forma por la polimerización de acrilamida y bisacrilamida, para formar poliacrilamida, entre placas de vidrio que dejan entre sí un espacio estrecho (1,0-1,5 mm). Antes de la siembra en el gel, las proteínas deben ser desnaturalizadas por calor en una solución amortiguadora de la muestra que contiene SDS, seguido por la introducción de la muestra a los pocillos del gel y la aplicación de una corriente eléctrica durante 2-3 horas. Las proteínas separadas son luego electrotransferidas a membranas compuestas por PVDF o nitrocelulosa que pueden ser probadas con anticuerpos, y a ello le sigue la detección del anticuerpo unido mediante anti-Ig conjugada con peroxidasa de rábano picante o similar. b) El gel SDS-PAGE de varios lisados celulares *(carriles 1-5)*, las proteínas purificadas *(carriles 6-12)* y los marcadores de peso moleculares *(carril 13)*, se tiñen con Coomassie Blue para revelar todas las proteínas corridas en el gel. (Cortesía del Dr. Sean Cullen, Trinity College Dublin, Irlanda.)

te, y es mejor utilizar antisueros policlonales para la inmunotransferencia con el fin de aumentar la oportunidad de incluir anticuerpos contra cualquier epítopo que sobreviva al procedimiento de desnaturalización; un número sorprendente lo hace.

Inmunoprecipitación de complejos antigénicos

Pueden utilizarse anticuerpos inmovilizados en un soporte sólido, como partículas de agarosa, para purificar un antígeno de una mezcla compleja de otros antígenos con el fin de explorar la naturaleza del antígeno y las proteínas a las cuales se une (Figura 6.20). Para ilustrar este enfoque, permítasenos imaginar que hemos producido un anticuerpo monoclonal contra un receptor de la superficie celular, como TLR4, que se sabe que desempeña una función importante en el reconocimiento de los componentes de los patógenos. Nos gustaría producir la **inmunoprecipitación** del receptor con la esperanza (¡posiblemente vana!) de que pueda haber una proteína suspendida de su cola citoplasmática y que pueda arrojar luz sobre el modo en que el receptor señala en el interior de la célula. Para hacer esto, deberíamos inmunoprecipitar el receptor mediante el empleo de nuestro anticuerpo monoclonal anti-TLR4 preparado de manera cuidadosa e inmovilizado en las partículas de agarosa. Después, debemos eliminar mediante lavado por centrifugación, un par de veces con una solución amortiguadora ("*buffer*") adecuada, el material no unido a la agarosa, seguido de la aplicación del material inmunoprecipitado en el gel de SDS-PAGE para ver lo que se ha obtenido.

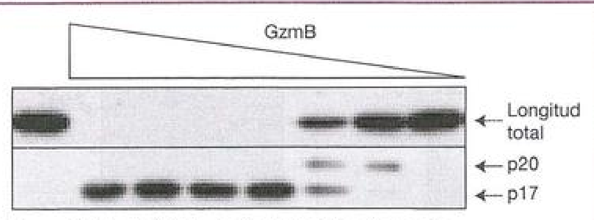


Figura 6.19. Análisis de inmunotransferencia.

Análisis del procesamiento de caspasa-3 por la proteasa CTL/NK, granzima B (GzmB). Los extractos proteicos, derivados de las células T Jurkat, se incubaron en presencia de concentraciones decrecientes de granzima B, una serinproteasa que se proporciona a las células diana tras el ataque por CTL o células NK. Los lisados celulares fueron separados sobre un gel SDS-PAGE, seguido por la transferencia a la membrana de nitrocelulosa y tinción con anticuerpos contra la caspasa-3. Obsérvese el modo en que la caspasa-3 es procesada (escindida) por concentraciones más altas de granzima B; este procesamiento activa al precursor de la caspasa-3 dentro de las células diana y estimula la apoptosis. (Cortesía del Dr. Colin Adrain, Trinity College Dublin, Irlanda.)

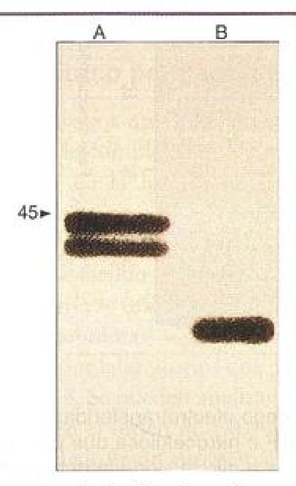


Figura 6.20. Inmunoprecipitación de antígeno de membrana.

Análisis de antígenos de clase I del CMH unidos a la membrana (véase p. 101). Las membranas provenientes de células humanas pulsadas con ^{35}S-metionina fueron disueltas en un detergente, mezcladas con un anticuerpo monoclonal contra moléculas HLA-A y B e inmunoprecipitadas con estafilococos. Una autorradiografía (A) del precipitado corrido en SDS-PAGE muestra las cadenas HLA-A y B como un doblete de peso molecular 43.000 (la flecha indica la posición de un marcador de 45.000). Si las membranas de las vesículas son digeridas con proteinasa K antes de la disolución, puede detectarse una banda marcada de peso molecular 39.000 (B) compatible con una orientación transmembrana de la cadena HLA: el fragmento C-terminal hidrófilo de 4.000 Da se extiende al interior del citoplasma y la porción mayor, reconocida por el anticuerpo monoclonal y por el reactivo para tipificación del tejido, está presente en la superficie celular (véase la Figura 4.17). (Cortesía del Dr. M.J. Owen.)

En el caso de que sólo el receptor hubiera sido inmunoprecipitado, se vería una banda única en el gel junto con bandas que corresponden al anticuerpo empleado para realizar la inmunoprecipitación. Cualquier banda inesperada es candidata para corresponderse con proteínas que interactúan con el receptor; es posible identificarla tomando una muestra de la mancha de la proteína del gel y someterla a un análisis de espectrometría de masas o secuenciación de proteínas. Como es de suponer, esto suele ser bastante más simple en la teoría que en la práctica. Sin embargo, puesto que la sensibilidad de las técnicas de identificación de proteínas ha aumentado a pasos agigantados en los últimos años, estos enfoques se han tornado cada vez más fructíferos.

La inmunoprecipitación también puede utilizarse para probar si la proteína A se une a la proteína B por la coexpresión de las proteínas dentro de la misma célula y la inmunoprecipitación de la proteína A (o la proteína B) con el uso de un anticuerpo adecuado y la corrida en un gel SDS-PAGE. Tras la transferencia del gel a una membrana para la realización del Western blot, la membrana ahora puede ser explorada con anticuerpos dirigidos contra la proteína B para ver si coinmunoprecipita con la proteína A. Sin duda, esta última técnica es la forma más utilizada del método de inmunoprecipitación y se ha empleado para aumentar el efecto en el estudio de las interacciones entre proteínas.

Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP; *Chromatin immunoprecipitation*)

Esta interesante modificación del ensayo de inmunoprecipitación estándar puede analizar el repertorio de secuencias promotoras de genes (o de otras regiones del DNA), un factor de transcripción u otra proteína de unión al DNA en una condición experimental en particular. Por ejemplo, si quisiéramos investigar la gama de promotores génicos que se unen al NFκB en condiciones no estimuladas en relación con la estimulada (p. ej., tratamiento con LPS), podríamos realizar un experimento de ChIP. Exponemos aquí cómo funciona el método. Las células se incuban durante un período definido en presencia de un estímulo (LPS en este ejemplo) o en su ausencia, seguido por el tratamiento breve con un agente químico que produce entrecruzamiento (p. ej., formaldehído) para garantizar que cualquier factor de transcripción unido a un promotor seguirá unido en las condiciones del ensayo. Después del entrecruzamiento químico de los complejos proteína–DNA, las células se lisan y la mezcla se somete a sonicación para romper el DNA de muy alto peso molecular en fragmentos más pequeños y manejables. A continuación, se utiliza un anticuerpo específico para el factor de transcripción de interés (es decir, NFκB en este caso) para inmunoprecipitar la proteína de la mezcla. La parte ingeniosa es que, debido al paso de entrecruzamiento, nuestro factor de transcripción estará unido a las regiones de DNA (es decir, los promotores a los cuales estaba unido) que se estaba transcribiendo activamente cuando terminamos el experimento. Entonces, se puede realizar una reacción de PCR en las muestras inmunoprecipitadas mediante el empleo de cebadores específicos para los genes que podrían ser regulados por el factor de transcripción de interés. Si nuestro factor de transcripción se ha unido a una región promotora de un gen, entonces el fragmento de DNA correspondiente se amplificará cuando llevemos a cabo el ensayo de PCR en esa muestra. Así, se puede comparar la cantidad de DNA amplificado bajo el control frente a las condiciones tratadas para determinar si el tratamiento (es decir, LPS en este caso) ha mejorado la

unión de nuestro factor de transcripción a promotores de genes específicos.

Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina basado en matrices

En una modificación adicional del ensayo ChIP estándar, como se describió antes, puede realizarse un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina basado en matrices (*ChIP on Chip*), como una matriz de DNA. Esto permite un análisis más global de los fragmentos de DNA inmunoprecipitados con un factor de transcripción particular, donde, más que buscar secuencias génicas específicas por PCR, podemos objetivamente buscar todos los fragmentos de DNA inmunoprecipitados a través de hibridación con un chip de micromatriz de DNA que porta secuencias de una enorme variedad de genes. Estas matrices pueden portar fragmentos génicos, presentados en localizaciones de manchas específicas en un soporte sólido (denominado chip), que representa el genoma entero, o puede ser más limitado y portar fragmentos génicos representativos de todas las citocinas, o quimiocinas, y así sucesivamente. Este tipo de ensayo implica llevar a cabo un experimento ChIP estándar, como se describió antes, seguido por la aplicación de fragmentos de DNA capturado sobre un chip de DNA. Esto permite la identificación de todas las secuencias de DNA unidas a la proteína de interés en la condición experimental.

Micromatrices de proteína y anticuerpo

Con la pronta disponibilidad de copias de cDNA de prácticamente todos los genes humanos, ahora es posible expresar casi todas las proteínas humanas sin mayores complicaciones; para purificarlas con el fin de obtener homogeneidad, se emplean trucos moleculares simples. Esto también es cierto para los genes que codifican proteínas de varias especies de levaduras, muchas bacterias, la mosca de la fruta y otros organismos. Mediante técnicas de expresión de proteínas en gran escala, se han producido series proteicas que contienen miles de proteínas independientes, o de fragmentos de proteínas, dispuestos sobre portaobjetos como micropuntos separados. En estas matrices, cada micropunto contiene una sola proteína y su identidad se conoce por su posición dentro de la serie. Las matrices pueden tratarse con una sonda de antisuero, o anticuerpo monoclonal, para determinar el espectro de proteínas con el cual reacciona el anticuerpo. Así, en un futuro cercano será posible determinar el espectro completo de autoanticuerpos (y su título relativo) presente en una muestra del paciente en un solo paso. Sólo se tiene que realizar la referencia cruzada entre los puntos que se "iluminan" tras la incubación con el anticuerpo y una lista que especifica la identidad de la proteína que se ha colocado dentro de esos puntos particulares (Figura 6.21). Es probable que estas matrices sean de utilidad para la identificación de nuevos autoantígenos, para el diagnóstico rápido y la clasificación de enfermedades autoinmunitarias, como también para monitorizar la evolución de la enfermedad. Otras aplicaciones consisten en la determinación rápida de proteínas que reaccionan en forma cruzada contra anticuerpos monoclonales o policlonales. En la práctica, se usan matrices más pequeñas centradas en enfermedades particulares con fines diagnósticos.

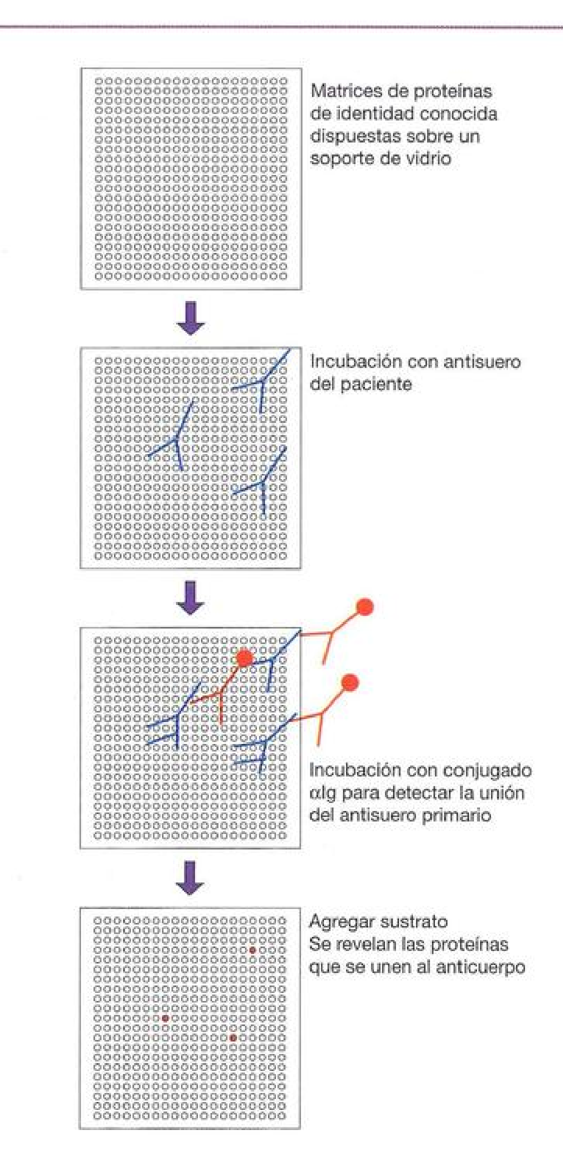


Figura 6.21. Elaboración de un perfil sérico mediante el análisis de micromatrices de proteínas.

Las matrices proteicas, que constan de miles de proteínas de identidad conocida dispuestas en un orden específico, pueden probarse con una muestra de suero de un paciente para determinar el espectro de proteínas en las cuales hay anticuerpos presentes. Los anticuerpos unidos se detectan con anticuerpos secundarios anti-Ig adecuados que conducen directamente a la identidad de las proteínas dentro de las manchas positivas.

De la misma manera que las matrices de proteínas, los anticuerpos también pueden disponerse como puntos separados en portaobjetos u otros soportes sólidos. Estas matrices se pueden utilizar para la captura simultánea de múltiples antígenos a partir de la misma muestra: por ejemplo, la matriz de anticuerpo anticitocina puede ser usada para detectar la presencia de múltiples citocinas dentro de la misma muestra.

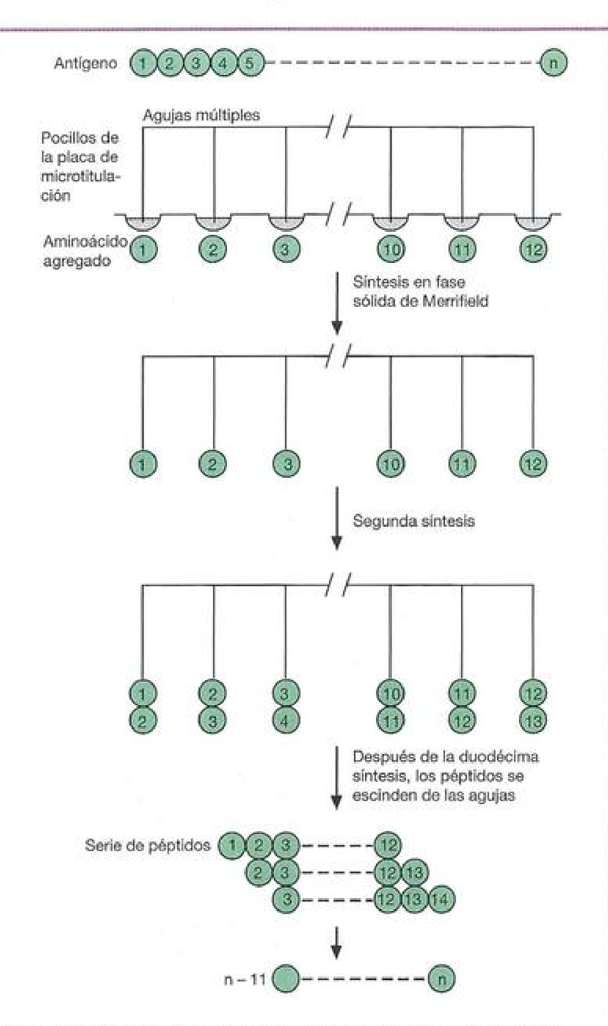


Figura 6.22. Síntesis de secuencias de péptidos superpuestas para el análisis de los epítopos (PEPSCAN).

Una serie de agujas colocadas en forma individual en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos proporciona un sitio para la síntesis del péptido en fase sólida. Una secuencia de estas síntesis como se muestra en la figura proporciona los nidos de péptidos requeridos. La incorporación de un enlace fácil de escindir permite que el péptido soluble sea liberado cuando finaliza la síntesis.

Mapeo de epítopos

Epítopos de células T

En los casos en los que se conoce la secuencia primaria de la proteína entera, la identificación de los epítopos de células T es comparativamente directa. Dado que estos epítopos tienen una estructura lineal, puede emplearse la síntesis en fase sólida con múltiples puntas para generar una serie de péptidos superpuestos, octámeros o nanómeros para las células T citotóxicas y, por lo común, decámeros o tetradecámeros para las células T *helper* (Figura 6.22); es posible interpretar su capacidad de reacción con líneas o clones de células T específicas para el antígeno con el objeto de caracterizar los epítopos activos.

La extracción por disección de los epítopos de células T donde el antígeno no se ha caracterizado es una tarea más desalentadora. Pueden obtenerse colecciones de péptidos al azar, pero deben diseñarse estrategias con el objeto de mantenerlas dentro de cantidades manejables. La información proveniente de datos acumulados depositados en diversos bancos de datos puede ser utilizada para identificar los residuos de anclaje importantes y las colecciones construidas que mantienen los aminoácidos pertinentes en estas posiciones. Así, una técnica de barrido de posición emplea una colección de péptidos en la cual un aminoácido en una posición particular se mantiene constante y todos los aminoácidos diferentes se utilizan en las otras posiciones.

Epítopos de las células B

Si se trata de epítopos de proteínas **lineales** formados directamente por secuencias primarias de aminoácidos, la unión del anticuerpo a péptidos superpuestos sintetizados, como se describió antes, permitirá identificarlos. Lamentablemente, la mayor parte de los epítopos en las proteínas globulares reconocidos por el anticuerpo son **discontinuos** y esto determina que el trabajo sea exigente, ya que no se puede predecir cuáles son los residuos que con más probabilidad se reúnan en el espacio para formar el epítopo. En la medida en que las secuencias lineales pequeñas pueden contribuir a un epítopo discontinuo, la estrategia de superposición de péptidos puede proporcionar algunos indicios.

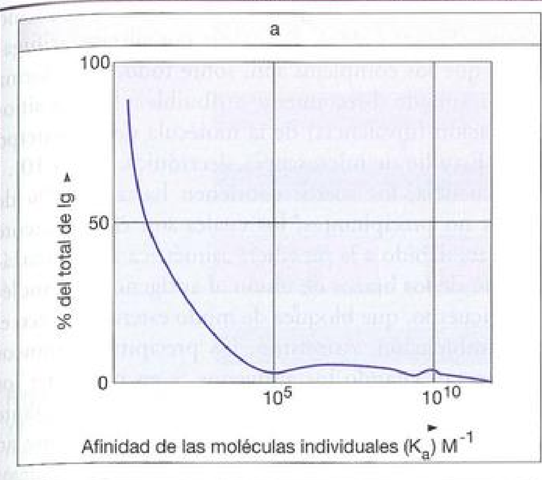
Un procedimiento potencialmente prometedor para este problema de imitar los residuos que constituyen esos epítopos (denominados **mimótopos** por Geysen) es mediante la producción de genotecas de bacteriófagos que contienen todos los posibles hexapéptidos al azar. Éstas se producen ligando insertos de oligonucleótidos degenerados (que codifican hexapéptidos) a una proteína de la cubierta del bacteriófago en un vector adecuado; la expresión apropiada en *E. coli* puede proporcionar hasta 10^9 clones diferentes. La ventaja del sistema radica en que un bacteriófago que expresa un hexapéptido dado en su proteína de cubierta también tiene la secuencia que codifica el hexapéptido en su genoma (véase p. 147). De acuerdo con esto, los ciclos secuenciales de selección, en los que los fagos reaccionan con un anticuerpo monoclonal biotinilado y luego se colocan en una placa con estreptavidina, deberían aislar aquellos que contienen péptidos que imitan el epítopo reconocido por el anticuerpo monoclonal; el estudio de la secuencia del nucleótido brindará luego la estructura del péptido.

Incluso los antígenos no proteicos en ocasiones pueden ser imitados empleando colecciones peptídicas; un ejemplo es el uso de una colección de hexapéptidos de D-aminoácidos con el fin de identificar un mimótopo para la *N*-acetilglucosamina. Otros han utilizado una única colección de cadenas simples Fv (scFv) para aislar un mimótopo idiotípico de un hidrato de carbono meningocócico.

Estimación de anticuerpos

Dado que los antígenos y los anticuerpos se definen por sus interacciones mutuas, cada uno puede ser utilizado para cuantificar al otro. Antes de comenzar con los detalles, vale la pena hacernos la pregunta: ¿qué significa "contenido de anticuerpos"?.

Si disponemos de una solución de un anticuerpo monoclonal, podemos definir su afinidad y especificidad con con-



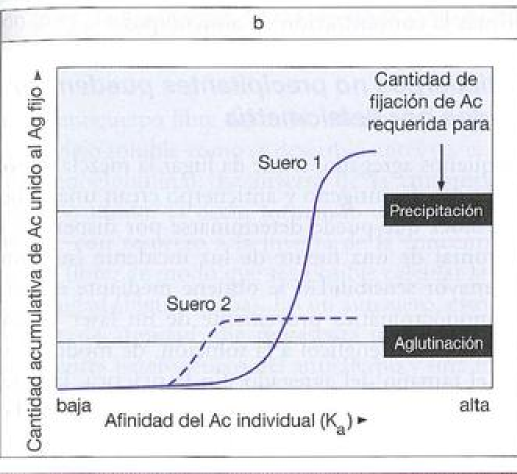


Figura 6.23. Distribución de la afinidad y el contenido de moléculas de IgG en un suero.

a) Distribución de las afinidades de moléculas de IgG para un antígeno dado en el suero de un individuo hipotético. Hay una cantidad de anticuerpos de baja afinidad que sería incapaz de unirse efectivamente con el antígeno, y se presume que cantidades mucho menores de anticuerpos de alta afinidad con distribución sesgada se originan por exposición a la infección. b) Relación de la distribución de afinidad con la positividad en las pruebas para la unión del antígeno. Si se reordena la ecuación de acción de las masas para todas las moléculas de la misma afinidad K_x y la concentración de los anticuerpos no unidos $[Ac_x]$: la cantidad de complejos formados $[AgAc] \alpha K_x[Ac_x]$ por [Ag] fijo.

Comenzando con las moléculas de menor afinidad en el suero, se grafica el total acumulativo de anticuerpos unidos para cada especie de anticuerpo hasta la que aparece en el gráfico. Como es de esperar, los anticuerpos de muy baja afinidad no contribuyen a las pruebas. El suero 2 tiene más anticuerpos de baja afinidad y casi nada de anticuerpos de alta afinidad, pero puede producir suficiente cantidad de complejos como para reaccionar en la prueba de la aglutinación sensible aunque, a diferencia del suero 1, forma una cantidad insuficiente como para dar una reacción de precipitación positiva. Como consecuencia de su "contenido" relativamente alto de anticuerpos, el suero 1 puede diluirse en una magnitud mucho mayor que el suero 2 y aún dar aglutinación positiva, es decir que tiene un título más alto. La prueba de precipitación es menos sensible, requiere mayor formación de complejos y el suero 1 no puede diluirse mucho antes de que esta prueba se torne negativa, o sea, el título de precipitinas será mucho más bajo que el título de aglutinación para el mismo suero.

siderable fiabilidad, y si está en estado puro y en su conformación nativa, sabremos que la concentración de anticuerpos es la misma que la de la inmunoglobulina en ng/mL u otra unidad. Cuando se determina el contenido de anticuerpos en un antisuero, el problema es diferente ya que la fracción inmunoglobulina está compuesta por una serie enorme de moléculas en cantidades y afinidad variables (Figura 6.23a).

Es posible obtener una constante K_a **promedio** para la IgG entera por el análisis global de la interacción con el antígeno como una ecuación de acción de las masas. Pero ¿cómo puede definirse el **contenido de anticuerpos** de la IgG de una manera significativa? La respuesta es, de hecho, la que uno desearía para describir el anticuerpo en términos funcionales prácticos: un suero que protege contra una dosis infecciosa dada de virus, que promueve la fagocitosis eficaz de las bacterias, que permite la bacteriólisis mediada por complemento, que neutraliza las toxinas, y así sucesivamente. Para estos objetivos, las moléculas de afinidad muy baja serían inútiles puesto que forman cantidades inadecuadas de complejos con el antígeno.

En la práctica, en un laboratorio de diagnóstico las pruebas funcionales requieren un intenso trabajo y en consecuencia son costosas y, por lo común, se busca una solución mediante el empleo de ensayos inmunoquímicos que determinan un compuesto del medio para anticuerpos de alta afinidad y su cantidad. En general, la mayoría de estas pruebas determina la cantidad total de anticuerpos que se unen a una cantidad dada de antígeno; podría ser una cantidad moderada de anticuerpos de alta afinidad o una cantidad mucho mayor de anticuerpos de más baja afinidad, o todas las combinaciones posibles entre ellos. Los sueros pueden compararse de acuerdo con su alto o bajo "contenido de anticuerpos" mediante la determinación de cuántos anticuerpos se unen al antígeno en una dilución fija del suero o bien verificando diluciones seriadas del suero para establecer en qué nivel una cantidad estándar de antígeno es suficiente para dar un resultado positivo de la unión. Esto se denomina **título de anticuerpos.** Para tomar un ejemplo, un suero podría diluirse 10.000 veces y aún dar una prueba de aglutinación positiva (véase la Figura 6.29). Este título de 1:10.000 permite realizar una comparación con otro suero mucho "más débil" que sólo tenga un título, supongamos, de 1:100. Obsérvese que el título de un suero dado variará de acuerdo con la sensibilidad de la prueba, ya que se necesitan cantidades mucho más pequeñas de anticuerpos para unirse al antígeno cuando la prueba tiene una sensibilidad elevada, como la aglutinación, que cuando es de baja sensibilidad, como la precipitación, la cual requiere concentraciones altas del producto antígeno-anticuerpo (Figura 6.23b).

Para resumir, puede compararse el "contenido eficaz de anticuerpos" de sueros diferentes por la observación de la

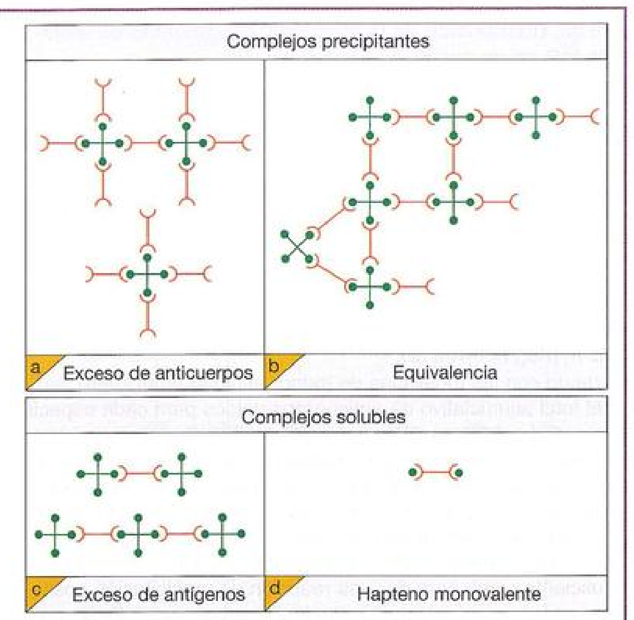


Figura 6.24. Representación esquemática de complejos formados entre un antígeno hipotético tetravalente (●——●) y un anticuerpo bivalente (●——●) mezclados en diferentes proporciones. En la práctica es poco probable que las valencias del antígeno se encuentren en el mismo plano o que estén formadas por determinantes idénticos como se sugiere en la figura. a) En exceso extremo de anticuerpos, las valencias del antígeno están saturadas y la relación molar Ac: Ag se aproxima a la valencia del antígeno. b) En la zona de equivalencia, la mayor parte del antígeno y del anticuerpo se combinan para formar grandes entretejidos que se agregan y producen inmunoprecipitados típicos. c) En exceso extremo de antígeno, donde las dos valencias de cada molécula de anticuerpo se saturan con rapidez, tiende a predominar el complejo Ag_2Ac. d) Un hapteno monovalente se une, pero es incapaz de establecer entrelazamientos con las moléculas de anticuerpo.

cantidad de anticuerpos unidos a la cantidad fija del antígeno de prueba, o puede determinarse el título, es decir, cuánto puede diluirse el suero antes de que la prueba se torne negativa. Éste es un equilibrio entre la cantidad y la afinidad, y con fines prácticos se utiliza como un indicador aproximado de la eficacia biológica.

Interacciones antígeno-anticuerpo en solución

Reacción de precipitación clásica

Cuando un antígeno en solución se agrega progresivamente a un antisuero potente, se forman precipitados del complejo antígeno-anticuerpo (Figura 6.24a,b). El entrecruzamiento de antígenos y anticuerpos da origen a estructuras reticulares tridimensionales, como lo sugirió John Marrack, las cuales coalescen en gran parte a través de la interacción Fc-Fc para formar grandes agregados que precipitan. A medida que se agrega cada vez más antígeno, se alcanza un óptimo (Figura 6.24b) después del cual se forma menos precipitado. En esta etapa, puede demostrarse que el sobrenadante contiene complejos solubles de antígeno (Ag) y anticuerpo (Ac), principalmente con una composición Ag_4Ac_3, Ag_3Ac_2 y Ag_2Ac (Figura 6.24c). En exceso extremo de antígeno (Figura 6.24c), el análisis por ultracentrifugación revela que los complejos son, sobre todo, de la forma Ag_2Ac, un resultado directamente atribuible a los dos sitios de combinación (divalencia) de la molécula del anticuerpo IgG (véase Estudio de microscopia electrónica, Fig. 3.10).

Con frecuencia, los sueros contienen hasta el 10% de anticuerpos no precipitantes, los cuales son efectivamente monovalentes debido a la presencia asimétrica de oligosacáridos en uno de los brazos de unión al antígeno de la molécula de anticuerpo, que bloquea de modo estereoquímico el sitio de combinación. Asimismo, los precipitados francos sólo se observan cuando los antígenos, y en particular los anticuerpos, están presentes en concentraciones bastante grandes. Por lo tanto, cuando se forman complejos que no precipitan espontáneamente, deben aplicarse más complejos para estimar la concentración de anticuerpos.

Los anticuerpos no precipitantes pueden ser detectados por nefelometría

Los pequeños agregados a que da lugar la mezcla de soluciones diluidas de antígeno y anticuerpo crean una nubosidad o turbidez que puede determinarse por dispersión del ángulo frontal de una fuente de luz incidente (nefelometría). La mayor sensibilidad se obtiene mediante el uso de una luz monocromática proveniente de un láser y con el agregado de polietilenglicol a la solución, de modo tal que aumenta el tamaño del agregado. En la práctica, la nefelometría se aplica más a la detección de antígenos que a la de anticuerpos (véase la Figura 6.17).

Los complejos formados por anticuerpos no precipitantes pueden ser precipitados

La capacidad relativa de unión al antígeno de un antisuero que forma complejos solubles puede estimarse por medio de un antígeno radiomarcado. El complejo se separa de la solución por el cambio de su solubilidad o por el agregado de un reactivo antiinmunoglobulina, como se observa en la Figura 6.25.

Medición de la afinidad del anticuerpo

Como se comentó en capítulos anteriores (véase p. 118), la fuerza de unión del anticuerpo con el antígeno se determina en términos de la constante de asociación (K_a) o su inversa, la constante de disociación (K_d), que gobierna la interacción reversible entre aquéllos y es definida por la ecuación de acción de las masas en equilibrio:

$$K_a = \frac{[\text{complejo AgAc}]}{[\text{Ag libre}][\text{Ac libre}]}$$

Con haptenos de tamaño pequeño, puede emplearse el método de diálisis en equilibrio para determinar K_a, pero por lo común tratamos con antígenos más grandes y es necesario aplicar otras técnicas. Un método consiste en agregar cantidades crecientes de antígeno radiomarcado para una cantidad fija de anticuerpos y luego realizar la separa-

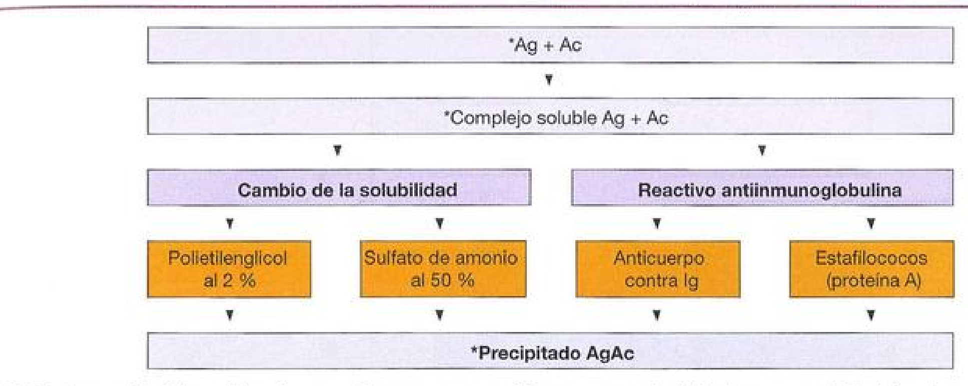


Figura 6.25. Capacidad de unión de un antisuero a un antígeno marcado (*Ag) por precipitación de complejos solubles, ya sea: a) por cambios de la solubilidad de modo que los complejos precipitan mientras que los Ag y Ac no combinados permanecen en solución, o b) por el agregado de un anticuerpo antiinmunoglobulina precipitante o de estafilococos que pueden unir la fracción Fc de la inmunoglobulina a la proteína A de su superficie; el complejo puede ser así determinado. El nivel de la marcación (p. ej., radioactividad) en el precipitado será una medida de la capacidad de unión del antígeno.

ción del anticuerpo libre del unido mediante la precipitación del complejo soluble como se describió antes (p. ej., por una antiinmunoglobulina). La inversa de la concentración de anticuerpo unido, es decir, formando un complejo, puede graficarse con respecto a la inversa de la concentración de antígeno libre, de modo que sea posible calcular la constante de afinidad (Figura 6.26a). En un antisuero, esto dará una constante de afinidad que representa un promedio de los componentes heterogéneos del anticuerpo y una medida de la cantidad efectiva de sitios de unión al antígeno operativos en las concentraciones más altas del antígeno utilizado.

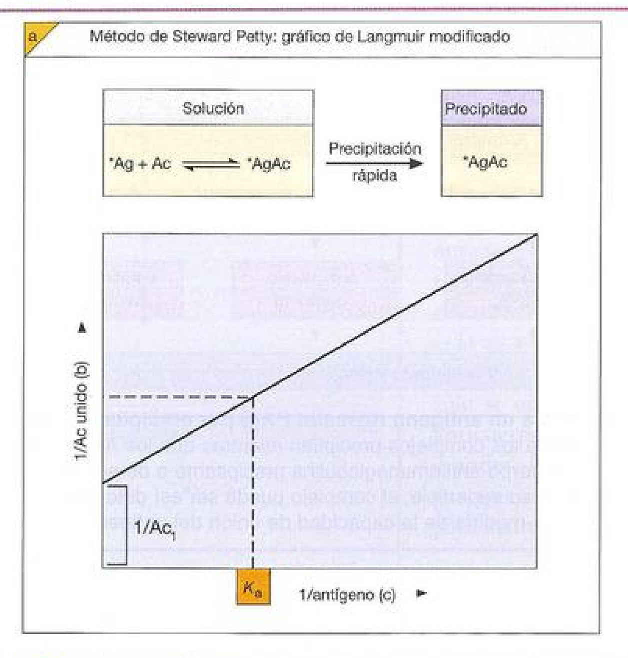
Se desarrollaron diversos tipos de ELISA que proporcionan una medición de la afinidad de los anticuerpos. En un sistema, se deja en primer lugar que los anticuerpos se unan a su antígeno y luego se agrega un agente caotrópico como el tiocianato en concentraciones crecientes con el objeto de romper la unión del anticuerpo; cuanto más alta sea la afinidad del anticuerpo, mayor será cantidad del agente que se requiere para reducir la unión. Otro tipo de ELISA para la determinación de la afinidad es el sistema competitivo indirecto diseñado por Friguet y cols. (Figura 6.26b). Una cantidad constante de anticuerpos se incuba con concentraciones seriadas de antígeno, y el anticuerpo libre en equilibrio se evalúa por la unión secundaria al antígeno en fase sólida. De este modo, los valores de K_a no son afectados por ninguna distorsión del antígeno causada por el marcado. De nuevo, esto destaca la superioridad de la determinación de la afinidad mediante el estudio de la **reacción primaria** con un antígeno en **estado soluble** en lugar de alterado desde el punto de vista conformacional por la unión a una fase sólida.

Cada vez más, se obtienen determinaciones de afinidad utilizando la **resonancia de plasmón superficial.** Un dispositivo sensor que consiste en un anticuerpo monoclonal acoplado al dextrán recubre una película de oro sobre un prisma de vidrio que reflejará la luz total e interna en un ángulo dado (Figura 6.27a). El antígeno presente en el pulso del líquido se unirá al dispositivo sensor y, al aumentar su tamaño, se altera el ángulo de reflexión. El sistema proporciona datos referidos a la cinética de asociación y disociación (y, por lo tanto, *K*) (Figura 6.27b) y permite realizar comparaciones entre los anticuerpos monoclonales y también, la evaluación de efectos sutiles de mutaciones.

Aglutinación de partículas recubiertas por antígeno

Mientras que el entrecruzamiento de los antígenos proteicos multivalentes con el anticuerpo produce precipitación, la interrelación entre células o partículas de gran tamaño con los anticuerpos dirigidos contra los antígenos de superficie conduce a la aglutinación. Dado que la mayoría de las células posee cargas eléctricas, se requiere una cantidad razonable de anticuerpos entre dos células antes de que se supere la repulsión mutua. De ahí que pueda ser difícil lograr la aglutinación de células que tengan sólo un número pequeño de determinantes a menos que se utilicen métodos especiales, como el tratamiento adicional con un reactivo antiglobulina. De la misma manera, la mayor avidez del anticuerpo multivalente IgM con respecto a la IgG hace que el primero sea más eficaz como agente aglutinante, molécula por molécula (Figura 6.28).

Las reacciones de aglutinación se utilizan para identificar bacterias y para tipificar eritrocitos; estas reacciones se observaron con leucocitos y plaquetas, e incluso con espermatozoides en ciertos casos de infertilidad masculina resultante de la presencia de aglutininas en el esperma. Debido a su sensibilidad y conveniencia, el uso de la prueba se ha extendido a la identificación de anticuerpos contra antígenos solubles que de modo artificial se adhieren sobre los eritrocitos, las partículas de látex o de gelatina. La aglutinación de las partículas de látex recubiertas por IgG se emplea para detectar los factores reumatoideos. Pruebas similares que utilizan partículas recubiertas con antígeno pueden llevarse a cabo en placas de microtitulación con fondo en U, donde es posible observar el patrón de sedimentación en el fondo de los pocillos (Figura 6.29); esto proporciona un indicador más sensible que la aglutinación macroscópica. La cuantificación de grados más sutiles de aglutinación se logra por nefelometría o un contador Coulter.



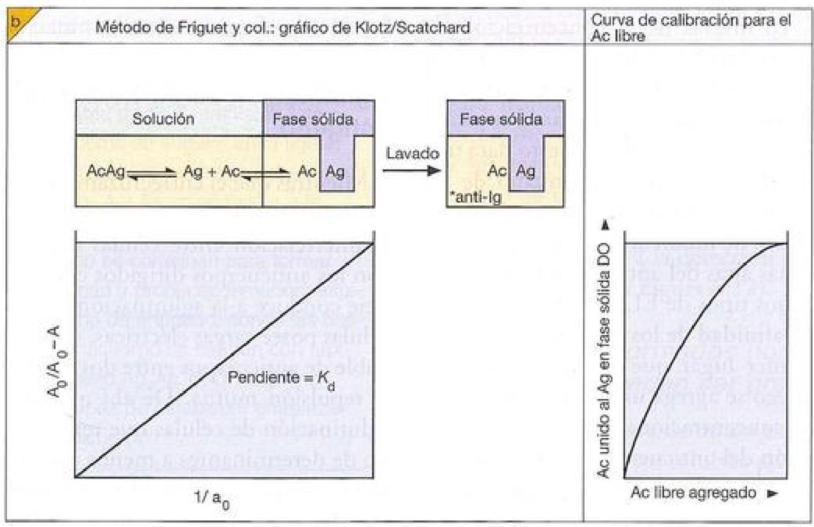


Figura 6.26. Determinación de afinidad con antígenos de gran tamaño.

El equilibrio entre Ag y Ac en diferentes concentraciones se determina de la siguiente forma:
a) en el caso de un antisuero policlonal se puede utilizar la modificación de Steward-Petty de la ecuación de Langmuir:

$$1/b = 1/(Ac_t \cdot c \cdot Ka) + 1/Ac_t$$

donde Ac_t, sitios de combinación de Ac totales; *b*, concentración de Ac unidos; *c*, concentración de Ag libre, y K_a, constante de afinidad promedio. En una concentración infinita de Ag, todos los sitios de Ac están unidos y $1/b = 1/Ac_t$. Cuando la mitad de los sitios de Ac están unidos, $1/c = K_a$.
b) Método de Friguet y col. para anticuerpos monoclonales. Primero, se establece una curva de calibración para los anticuerpos libres por la estimación de la proporción de unión al antígeno en fase sólida y el anticuerpo unido se determina por anti-Ig marcada por enzimas (ELISA: véase el texto). Utilizando una curva de calibración, la cantidad de Ac libre en equilibrio con Ag en solución se determina por la cantidad de Ac que se une con el Ag en fase sólida (la cantidad de antígeno en fase sólida no basta para afectar materialmente el equilibrio de la solución). La combinación de las ecuaciones de Klotz y Scatchard da:

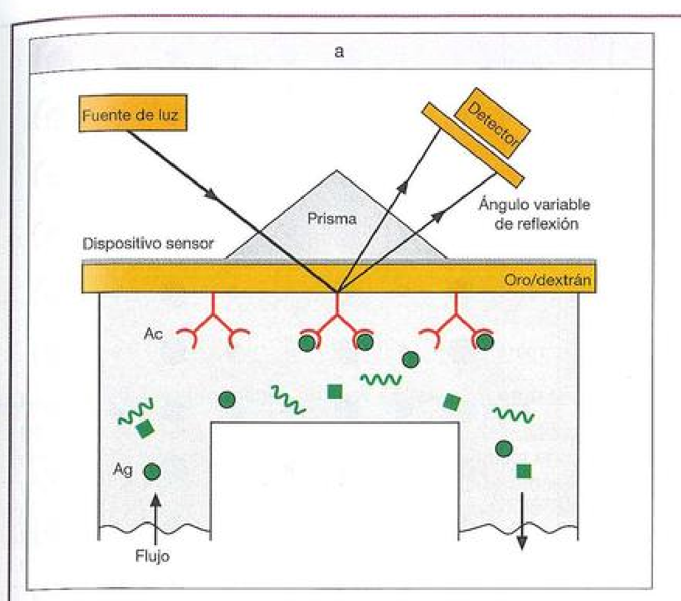
$$A_0/A_0 - A = 1 + K_d/a_0$$

Donde A_0 = densidad óptica (DO) de ELISA para el Ac en ausencia de Ag; A = DO en presencia de concentración de Ag a_0, donde a_0 es aproximadamente una concentración de 10 × de Ac. La pendiente del gráfico da K_d (las moléculas marcadas tienen un asterisco).

Inmunoensayos para anticuerpos utilizando antígenos en fase sólida

Principio

El contenido de anticuerpo de un suero puede evaluarse por la capacidad de unión al antígeno, el cual se ha inmovilizado por adsorción física a un tubo de plástico o placa de microtitulación con múltiples pocillos; la inmunoglobulina unida puede ser estimada luego agregando una anti-Ig marcada producida en otra especie (Figura 6.30). Considérese, por ejemplo, la determinación de autoanticuerpos anti-DNA en el lupus eritematoso sistémico (LES) (véase



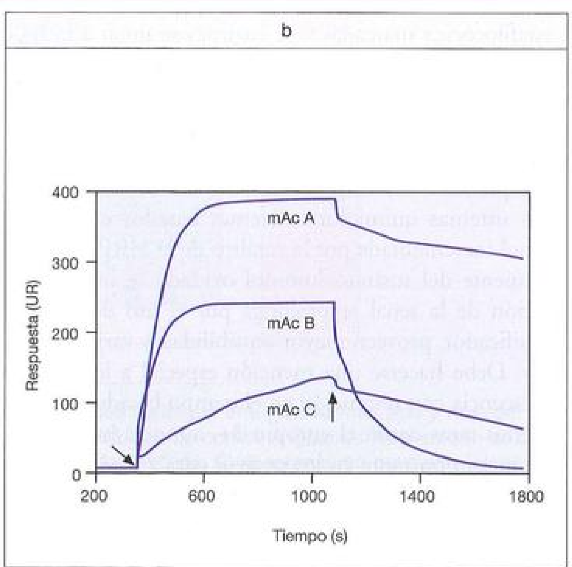


Figura 6.27. Resonancia plasmón de superficie.

a) Principio: a medida que el antígeno se une al sensor recubierto con anticuerpo, se altera el ángulo de reflexión. b) Esto señala las velocidades de asociación durante el pulso del antígeno y la disociación. En este ejemplo, el mismo antígeno fue inoculado en tres anticuerpos monoclonales (mAc) inmovilizados. Las flechas indican el comienzo y el fin de la inoculación del antígeno, que luego es seguida por el flujo del buffer. Obsérvense las diferencias entre los anticuerpos en las velocidades de asociación y disociación. (Los datos fueron proporcionados por cortesía del doctor R. Karlsson, Biacore AB, y reproducidos de Panayotou G. [1998] Surface plasmon resonance. En Delves P.J. y Roitt I.M. [eds] *Encyclopedia of Immunology*, 2nd ed. Academic Press, con autorización.) El sistema puede ser utilizado con el antígeno inmovilizado en el sensor y el anticuerpo en la fase líquida, o puede aplicarse a cualquier ensayo de unión a un único ligando.

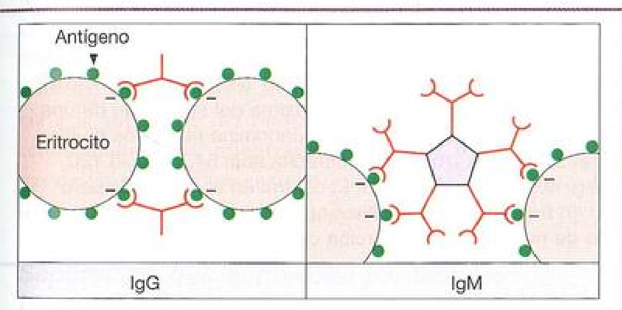


Figura 6.28. Mecanismo de aglutinación de partículas recubiertas con antígeno por entrecruzamientos para formar grandes agregados macroscópicos. Si se utilizan eritrocitos, se necesitan varios entrecruzamientos para vencer la carga eléctrica en la superficie celular. La IgM es superior a la IgG como elemento aglutinador debido a su unión multivalente y a que las células con carga eléctrica están más separadas.

p. 479). Cuando se agrega suero de un paciente a una placa de múltiples pocillos recubiertos con antígeno (en este caso, DNA), los autoanticuerpos se unirán al antígeno, y las proteínas remanentes del suero pueden eliminarse con facilidad por lavado. El anticuerpo unido se estima ahora por el agregado de IgG de conejo purificada antihumana marcada con ^{125}I; después de la eliminación por lavado del exceso de reactivo no unido, la radiactividad del tubo será una medida clara del contenido de autoanticuerpos en el suero del paciente. La distribución de anticuerpos en diferentes clases puede determinarse con antisueros específicos. Tómese la prueba radioalergosorbente (RAST) para anticuerpos IgE en pacientes alérgicos. El alérgeno (p. ej., extracto de polen) está acoplado de manera covalente a un inmunosorbente, en este caso un disco de papel, que luego se pone en contacto con el suero del paciente. La cantidad de IgE específica unida al disco de papel se estima por el agregado de anti-IgE marcada.

Hay una amplia variedad de reactivos marcados

A pesar de que proporcionan una sensibilidad extremadamente elevada, los reactivos radiomarcados tienen ciertas desventajas, como la pérdida de la sensibilidad durante la conservación debido a la desintegración radiactiva, el deterioro del reactivo marcado a causa del daño por radiación y la necesidad de tomar precauciones para reducir la exposición de las personas a la radioactividad. Por consiguiente, a menudo se utilizan otros tipos de marcadores en inmunoensayos.

ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzimas). Las enzimas que dan un producto soluble coloreado de la reacción son en la actualidad los marcadores que se utilizan con más frecuencia, y las enzimas más empleadas son la peroxidasa del rábano (en inglés, *horseradish peroxidase,* HRP) y la fosfatasa alcalina del intestino de ternero (en inglés, *alkaline phosphatase,* AP). La glucosaoxidasa de *Aspergillus niger,* la ureasa de soja y la β-galactosidasa de *Escherichia coli* constituyen otras alternativas. Una clara ventaja en la amplificación de la reacción de la fosfatasa es el uso del fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido (NADP) como sustrato para generar NAD, el que ahora actúa como una coenzima para un segundo sistema enzimático.

Otros marcadores. La proteína G estreptocócica o la proteína A estafilocócica marcadas con enzimas se unen a la IgG. La conjugación con la vitamina biotina se emplea con frecuencia porque este conjugado puede detectarse con facilidad por su reacción con la avidina o la estreptavidina ligada a enzima (esta última da un menor fondo de unión); ambas se unen con una gran especificidad y afinidad ($K = 10^{15}M^{-1}$).

Los sistemas quimioluminiscentes basados en la reacción luminol incrementada por la catálisis de la HRP, donde la luz proveniente del sustrato luminol oxidado se intensifica y la duración de la señal se prolonga por el uso de un reactivo intensificador, proveen mayor sensibilidad y variaciones dinámicas. Debe hacerse una mención especial a los ensayos de fluorescencia con resolución en el tiempo basados en quelatos de tierras raras como el europio 3+, aunque éstos tienen un papel más importante en los ensayos para antígenos.

Detección de la formación de inmunocomplejos

Se describieron muchas técnicas para detectar complejos circulantes, y como consecuencia de las variaciones en el tamaño, la capacidad de fijar el complemento y la clase de IgG de los diferentes complejos, es útil aplicar más de un método. Dos métodos bastante buenos para el uso general son:

1. Precipitación de complejos de IgG a partir del suero en presencia de concentraciones de polietilenglicol que no reducen de manera significativa las cantidades de monómeros de IgG, seguido por la estimación de IgG en el precipitado mediante inmunodifusión radial simple (SRID) o nefelometría con láser.
2. Unión de complejos que contienen C3b a perlas recubiertas con conglutinina bovina (véase p. 20) y estimación de la Ig unida con anti-Ig marcada con enzimas.

Otras técnicas son: a) estimación de la unión de ^{125}I-C1q a complejos por coprecipitación con polietilenglicol; b) inhibición de la agregación de partículas recubiertas con IgG inducida por complejos del factor reumatoideo; c) detección de complejos séricos con anti-Ig radiomarcada capaces de unirse a los receptores C3b (y en menor medida, al Fc) en la línea de células Raji. Los sueros de pacientes con enfermedad por inmunocomplejos a menudo forman un crioprecipitado cuando se los deja reposar a 4°C. La determinación del C3 sérico y su producto de conversión C3c algunas veces es útil. Los complejos unidos a tejidos por lo común se visualizan por tinción inmunofluorescente de biopsias con conjugados antiinmunoglobulinas y anti-3 (véase la Figura 15.18).

Aislamiento de subpoblaciones de leucocitos

Dada la complejidad de las interacciones entre las células del sistema inmunitario, a menudo es casi imposible decidir quién está haciendo qué cosa y a quién, a menos que se adopte un enfoque reduccionista mediante la purificación de poblaciones celulares específicas para estudiarlas tras el aislamiento. Es claro que este enfoque también tiene sus inconvenientes, ya que las poblaciones celulares purificadas se comportan de

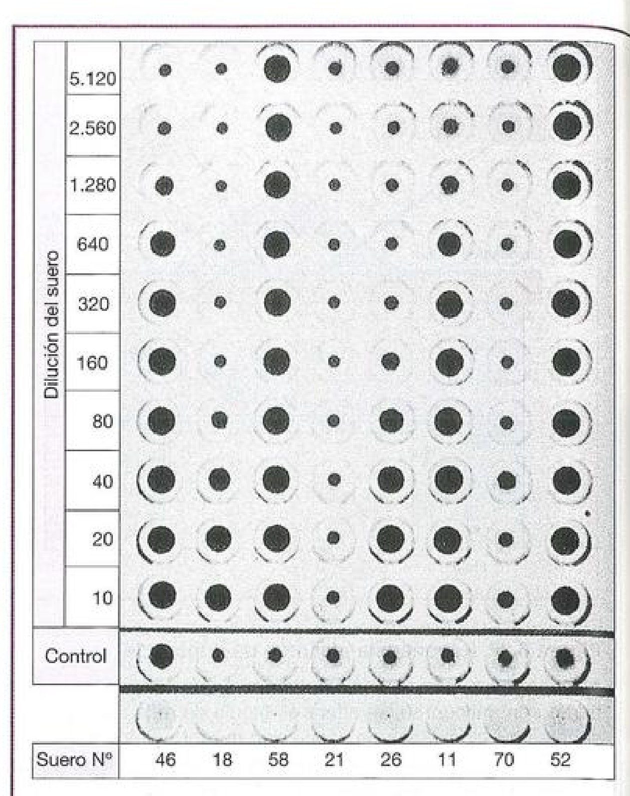


Figura 6.29. Prueba de hemaglutinación para autoanticuerpos antitiroglobulina. Las células recubiertas con tiroglobulina fueron agregadas a diluciones de sueros de pacientes. Como control se agregaron células no recubiertas a una dilución del suero 1:10. En una reacción positiva, las células sedimentan como un manto sobre el fondo del pocillo. Debido a la forma en V del corte transversal de estos pocillos, en las reacciones negativas se depositan en la base de la "V" que forman un botón pequeño, reconocible con facilidad. La inversa de la dilución máxima del suero que da una reacción positiva inequívoca se denomina título. Los títulos que se leen de izquierda a derecha son: 640, 20, >5.120, neg, 40, 320, neg, >5.120. El control en el caso del suero n° 46 fue levemente positivo y este suero debería ser probado de nuevo tras la absorción con células no recubiertas.

manera distinta *in vitro* e *in vitro*. Sin embargo, la combinación de los enfoques *in vitro* e *in vitro* ha sido muy importante y cada uno tiene su lugar en el arsenal del inmunólogo. Varias técnicas se emplean de manera sistemática para enriquecer las poblaciones celulares del sistema inmunitario en grados variables de pureza. La mayoría se basa en características singulares de determinadas poblaciones celulares que varían en su tamaño, la capacidad de adherirse al plástico o de expresar un antígeno en la superficie de la célula. Los anticuerpos contra marcadores CD particulares son especialmente útiles para aislar poblaciones específicas de leucocitos cuando se utilizan junto con una diversidad de métodos de cribado ingeniosos, como veremos a continuación.

Técnicas para grandes volúmenes

Separación basada en parámetros físicos

La separación de células sobre la base de su **velocidad de sedimentación** diferencial, que de manera aproximada se

Agregar Ag
Agregar suero del paciente
Agregar anti-Ig marcada
lavado
lavado
lavado
Tubo plástico
Medición del marcado

Figura 6.30. Inmunoensayo en fase sólida para anticuerpos.

Para reducir la unión inespecífica de la IgG a la fase sólida después del agregado del primer reactivo, es habitual agregar una proteína irrelevante, como leche en polvo descremada o albúmina sérica bovina, con el fin de bloquear cualquier sitio libre en el plástico. La conformación de una proteína a menudo es alterada por unión al plástico, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal que distingue entre las formas *apo* y *holo* del citocromo *c* en solución se combina igualmente bien con ambas proteínas en fase sólida. El acoplamiento covalente al plástico carboxiderivado o la captura del sustrato antigénico por el anticuerpo en la fase sólida puede disminuir en ocasiones este efecto.

correlaciona con el **tamaño celular**, puede llevarse a cabo por centrifugación a través de un gradiente de densidad. Es posible aumentar la masa celular mediante la unión selectiva con partículas a su superficie, como eritrocitos; el ejemplo más notable es la formación de rosetas cuando los eritrocitos de carnero se unen al CD2 de células T humanas.

La **densidad de flotación** es otro parámetro útil. La centrifugación de sangre entera en Ficoll-Hypaque isotónico (metrizoato de sodio) de densidad 1,077 g/mL deja las células mononucleares (linfocitos, monocitos y *natural killer* o NK) flotando en una banda en la interfaz, mientras que los eritrocitos y los leucocitos polimorfonucleares, más densos, sedimentan en el fondo del tubo (Figura 6.31). La **adherencia** a la superficie del plástico elimina en gran medida las células fagocíticas, mientras que el paso a través de columnas de lana de nailon enriquece mucho las poblaciones linfocíticas de células T en detrimento de las células B.

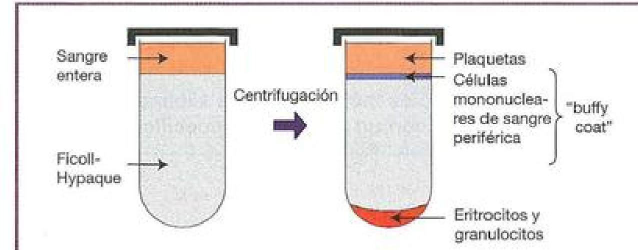


Figura 6.31. Separación de leucocitos por centrifugación a través de un gradiente de densidad.

La sangre entera se deposita cuidadosamente por el borde del tubo en Ficoll-Hypaque o en un medio similar de densidad conocida y se procede a la centrifugación a 800 g durante 30 min. Esto produce la sedimentación de los eritrocitos y los granulocitos en el fondo del tubo de centrifugación. En la interfaz entre las dos capas, se encuentra una capa enriquecida de células mononucleares de sangre periférica ("*buffy coat*") que contiene sobre todo linfocitos T y B, células NK y monocitos.

Separación que aprovecha parámetros biológicos

Las células fagocíticas activas que captan partículas pequeñas de hierro pueden ser manipuladas con un imán externo. Los linfocitos que se dividen como respuesta a un activador policlonal (véase p. 217) o a un antígeno específico pueden eliminarse si se les permite incorporar 5-bromodesoxiuridina (BrdU); esto los torna susceptibles al efecto letal de la irradiación UV.

Selección por anticuerpos

Se dispone de varios métodos para la selección de células recubiertas de manera específica con anticuerpos, algunos de los cuales se ilustran en la Figura 6.32. El agregado de complemento o de conjugados de toxina anti-Ig eliminará estas poblaciones. Las perlas magnéticas cubiertas con anti-Ig forman cúmulos con las células recubiertas con el anticuerpo que pueden separarse fácilmente de las células no recubiertas. Otra técnica de selección útil para grandes volúmenes consiste en enfrentar las células recubiertas con anti-Ig adsorbida a una superficie. Una variación en este tema, utilizada para el aislamiento de células precursoras de la médula ósea con anti-CD34, es recubrirlas con el anticuerpo tratado con biotina y seleccionarlas con una columna de avidina o perlas magnéticas con avidina. Los combinados de anticuerpos que recubren las perlas se utilizan en las columnas de separación de células para la depleción de poblaciones específicas que tienen, por ejemplo, linfocitos enriquecidos en $CD4^+CD45RA^-$ o $CD4^+CD45RO^-$.

Selección celular por FACS

Las células recubiertas con anticuerpos fluorescentes pueden ser separadas por el clasificador celular activado por fluorescencia (*fluorecence-activated cell sorter,* FACS) como se describe en el recuadro de Avances y descubrimientos 6.2 y en la Figura 6.33 (véase una descripción más detallada bajo el título "Citometría de flujo", p. 154). La técnica es relativamente simple, pero la tecnología requerida para lograrla es muy sofisticada. Las células suelen teñir con anti-

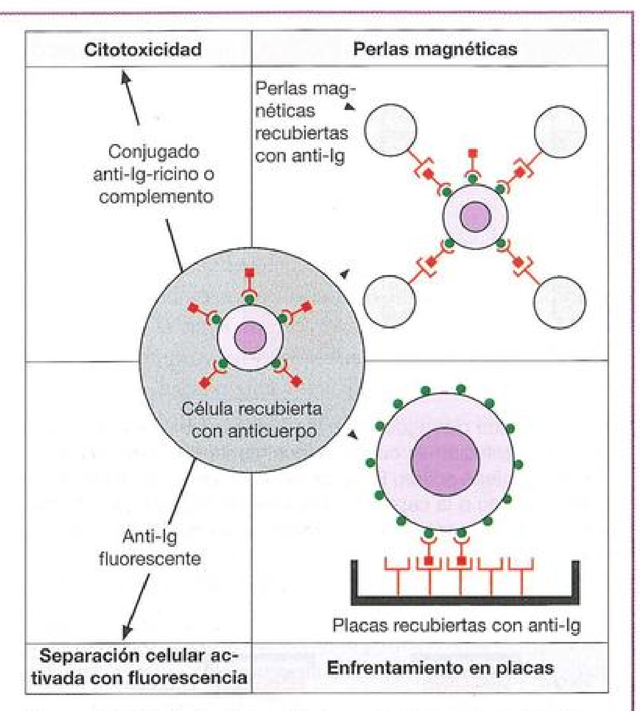


Figura 6.32. Principales métodos para la separación de células recubiertas con un anticuerpo específico.

cuerpos dirigidos contra marcadores particulares de la superficie de la célula (como CD4 o CD19) y el instrumento separa las células positivas o negativas para este marcador en tubos de recolección diferentes.

Enriquecimiento de poblaciones específicas para el antígeno

La proliferación selectiva de células T específicas por estimulación repetida con antígeno y células presentadoras en cultivo, por lo común alternada con el tratamiento con interleucina 2 (IL-2), conduce al enriquecimiento de células T heterogéneas específicas para los diferentes epítopos en el antígeno. Estas **líneas de células T** pueden distribuirse en los pocillos de las placas de microtitulación en una dilución lo suficientemente alta como para que **en promedio** haya menos de una célula por pocillo; cuando las células son estimuladas a proliferar con antígeno o anti-CD3, producen clones de células T que pueden ser mantenidas con un cuidado y una atención muy obsesivos, pero ¡Dios mío, pueden ser un gran fastidio! Los **hibridomas de células T** potencialmente inmortales, similares en principio a los hibridomas de células B, pueden establecerse por fusión de líneas celulares con una línea de células T tumorales y la clonación posterior.

Generación de células dendríticas *in vitro*

Debido a la dificultad de aislar grandes cantidades de células dendríticas, muchos inmunólogos las producen *in vitro* mediante la inducción de su diferenciación a partir de médula ósea recién aislada. El procedimiento consiste en extraer médula ósea de los huesos largos de ratones seguida por el agregado de GM-CSF durante 11 días. Las células resultantes son predominantemente células dendríticas CD11c^{+}, CD8^{-}, de clase II^{+} del CMH y responden a la estimulación con muchos PAMP. También pueden utilizarse métodos similares para producir células dendríticas a partir de cultivos de esplenocitos.

Immortalización de las células B primarias

Dado que las células B primarias mueren con rapidez en cultivo, se han establecido procedimientos para la transformación de estas células con virus de Epstein-Barr (EBV), que de modo selectivo inmortaliza las células B y permite su crecimiento indefinido *in vitro*. El procedimiento utilizado para generar líneas de células B transformadas por EBV se estableció hace más de 25 años y es ampliamente utilizado. Las partículas de EBV se obtienen a partir de una línea celular infectada por EBV a través de lisis. A continuación, los cultivos de linfocitos humanos se inoculan con el virus libre, que ingresa en las células B a través de la molécula de superficie celular CD21 (CR2; receptor para los fragmentos C3 del complemento). La propagación de cultivos infectados por EBV durante varias semanas conduce a la aparición de células B inmortalizadas. Sin embargo, las células T citotóxicas (Tc) específicas para EBV pueden surgir en el cultivo, que destruyen las células B infectadas, lo que conduce a una falla para producir células transformadas. Esto puede ser contrarrestado por la eliminación de las células T mediante métodos de inmunodepleción (como se indica más arriba), por supresión de la activación de las células T mediante el agregado de ciclosporina a los cultivos o por el agregado de activadores policlonales de células T (como fitohemaglutinina [PHA]), que estimula la rápida proliferación de células T y la apoptosis antes de que puedan generarse células Tc.

Interacciones celulares in vitro

Es obvio que los métodos mencionados antes para la depleción, el enriquecimiento y el aislamiento de poblaciones de células individuales le permiten al investigador estudiar las interacciones celulares a través de la combinación juiciosa de varias poblaciones purificadas. Estas interacciones suelen ser más eficaces cuando las células funcionan dentro de algún tipo de red del estroma que se asemeja al sistema de los tejidos donde su función se expresa de manera óptima. Por ejemplo, la colonización de rudimentos de timo fetal murino en cultivo con precursores de células T permite seguir el patrón de proliferación, maduración, reordenamiento de TCR y selección positiva y negativa como se observa normalmente *in vitro* (véase pp. 290-291). Un sistema aún más refinado implica la incorporación de poblaciones linfoides seleccionadas a células del estroma disgregadas, derivadas de los lóbulos tímicos fetales, a las que se les eliminaron las células linfoides endógenas con desoxiguanosina. Las células pueden ser centrifugadas, y el sedimento obtenido se cocultiva con la técnica de gota pendiente (*hanging drop*); luego de la transferencia a las condiciones normales de cultivo del órgano después de unas horas, de un

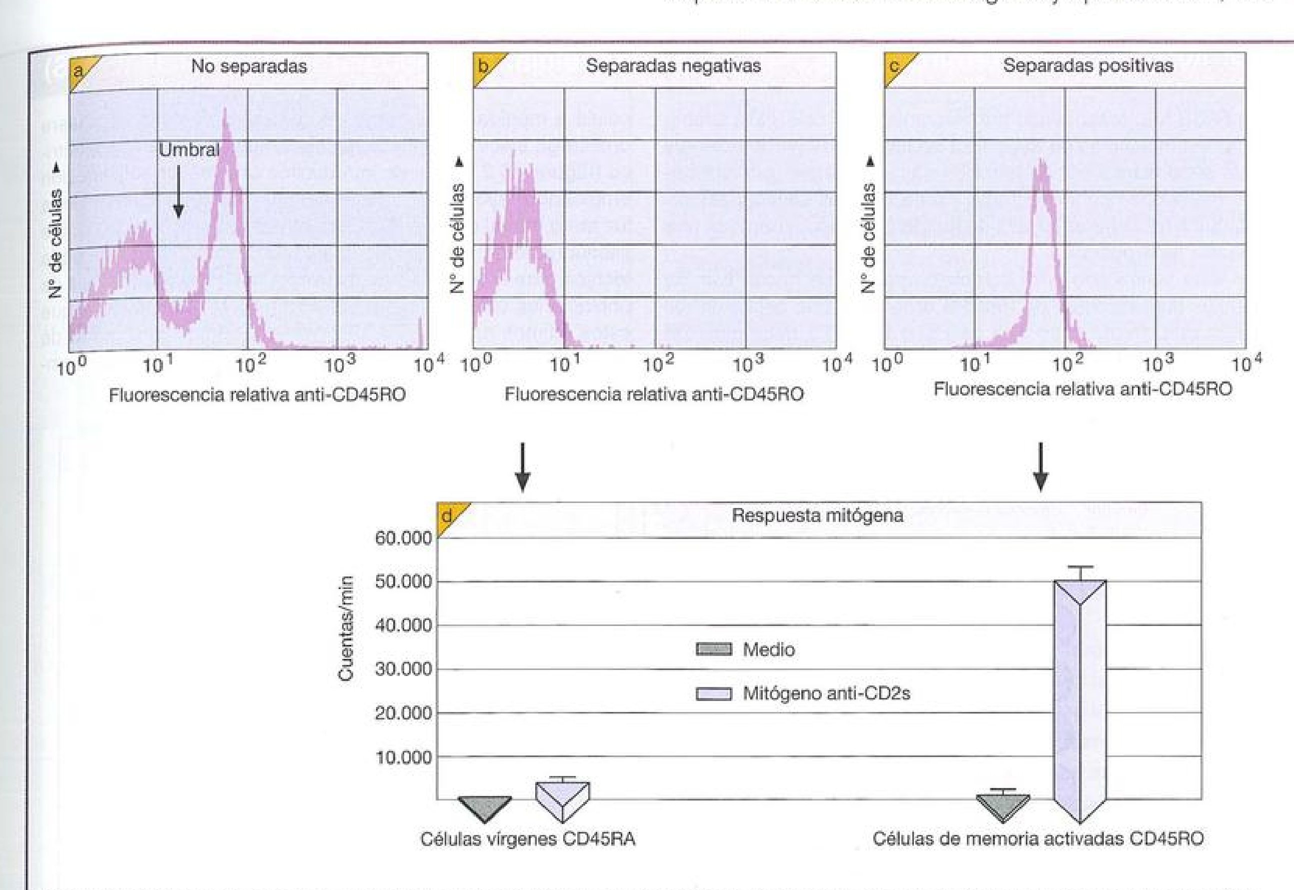


Figura 6.33. Separación de las células T de memoria activadas (CD45RO positivas) de las células T no estimuladas vírgenes (CD45RO negativas, pero positivas para la isoforma CD45RA) de la sangre periférica en el FACS después de teñir las células viables en frío con un anticuerpo monoclonal fluorescente contra CD45RO (véase p. 257). Las células no separadas mostraron dos picos a); las células con intensidad de fluorescencia menor que el umbral arbitrario fueron separadas de aquellas con intensidad más alta y dieron poblaciones b) negativas (CD45RA) y c) positivas (CD45RO), las que fueron estudiadas en cuanto a su respuesta proliferativa para una mezcla de dos anticuerpos monoclonales anti-CD2 (OKT11 y GT2) en presencia de un 10% de células presentadoras de antígenos d). A los 3 días se agregó ^{3}H-timidina y las células se contaron después de 15 horas. La población de células de memoria proliferó claramente, mientras que la población de células no estimuladas no lo hizo. (Cortesía de D. Wallace y R. Hicks.)

modo bastante mágico se produce la reagregación a lóbulos intactos y, a continuación, se desarrollan los distintos procesos de maduración y diferenciación.

Se pueden producir animales que tienen en esencia una población de células T con una única especificidad mediante la introducción de genes α y β para el receptor de células T a partir de un clon de células T, como un transgén (véase más adelante); dado que los genes ya están reordenados, su presencia en cada célula T en desarrollo cambiará cualquiera de las otras recombinaciones del gen *V*β.

Nadie ha tenido éxito en la clonación de células B primarias debido a que se mueren rápidamente cuando se las coloca en cultivo celular. Sin embargo, es posible cultivar hibridomas de células B inmortalizadas o de líneas celulares transformadas por el EBV, aunque como sucede con las células T, se han generado animales transgénicos que expresan el mismo anticuerpo en todas sus células B.

Análisis de la expresión génica

El análisis de patrones de expresión génica puede suministrar abundante información acerca de lo que una célula o población celular está haciendo, o hará, en un momento particular en el tiempo. Para analizar la cohorte de genes que se expresan en una población celular, sea en el estado estable o en respuesta a un estímulo particular, el RNA mensajero (mRNA) se extrae y se analiza por un método que permite detectar los genes de interés. El mRNA puede ser analizado por transferencia Northern blot, en el cual una sola sonda génica se hibrida con la muestra del mRNA, o por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa que utiliza como cebador a la transcriptasa inversa), en la cual los genes de interés pueden ser amplificados por la formación inicial de una copia de cDNA usando transcriptasa inversa, seguida de la amplificación génica mediante cebadores específicos, complementarios de la secuencia de interés. Mientras que la transferencia *Northern blot* y la RT-PCR pueden dar información sobre más de un transcrito, este método requiere cantidades importantes de mRNA y es relativamente lento.

El desarrollo de tecnologías de micromatrices permite ahora la medición simultánea de la expresión de miles de genes en un solo experimento. Los oligonucleótidos o los fragmentos de cDNA son depositados por medios robóticos

Avances y descubrimientos 6.2—Clasificador celular activado por fluorescencia (FACS)

El FACS fue desarrollado por Herzenbergs y cols. para cuantificar las moléculas de superficie en las células pertenecientes a la serie blanca por su reacción con anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromo y para usar las señales así formadas para separar células de fenotipo definido a partir de una mezcla heterogénea.

En este sofisticado pero complejo aparato, se hacen fluir las células fluorescentes de manera ordenada, una célula detrás de la otra, frente a un haz de rayos láser. La determinación cuantitativa de la señal fluorescente en un tubo fotomultiplicador convenientemente colocado retransmite una señal a la célula a medida que emerge de una gotita; la célula adquiere una carga eléctrica y puede ser separada en un campo eléctrico (Figura A6.2.1). Puede introducirse una mayor sofisticación empleando rayos láser y fluorocromos y una dispersión de la luz tanto frontal como a 90°. Esto se tratará en la sección sobre citofluorometría de flujo que describe cómo puede utilizarse la técnica para el análisis cuantitativo de múltiples parámetros de poblaciones celulares (véase la Figura 6.14). Basta decir que estos últimos aparatos FACS permiten, con un alto grado de discriminación, el aislamiento de células de un fenotipo complejo a partir de una población heterogénea.

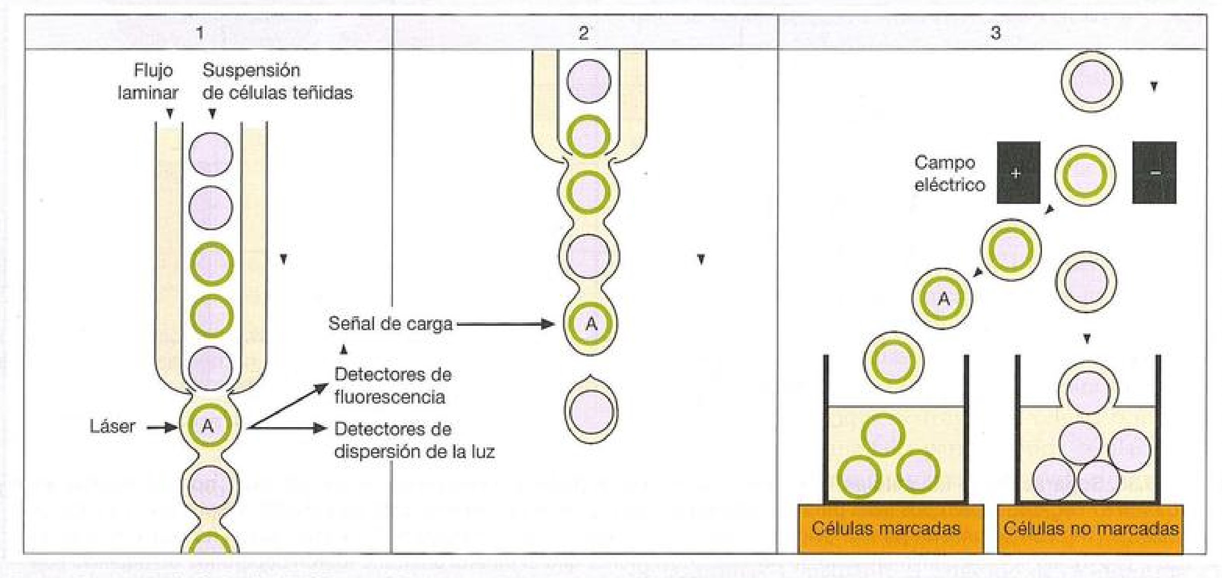


Figura A6.2.1. Principio del FACS para la citometría de flujo de la fluorescencia en células teñidas (círculos con anillos de color *verde*) y separación física de las células no teñidas. La señal de carga puede ser activada para separar las células de alta fluorescencia de las de baja fluorescencia; y mediante la dispersión de la luz, las de gran tamaño, de las de pequeño tamaño; y las muertas, de las viables.

sobre micromatrices de DNA (chips génicos) y el cDNA generado, por ejemplo, mRNA de la célula T, se marca o hibrida con los genes sobre la micromatriz. Esto proporciona una comparación cuantitativa de la expresión de cada gen presente en las micromatrices. Con la acumulación de esos datos, es posible elaborar un cuadro completo del tipo de genes que se expresa en determinadas células (Figura 6.34). Un área en la que esta técnica se está desarrollando con rapidez es en el análisis de diferencias en la expresión génica entre una célula tumoral y su equivalente normal, lo cual permite esclarecer posibles dianas para la intervención terapéutica.

Sin embargo, no todo lo que brilla es oro, y es absolutamente cierto que las micromatrices de DNA no son una solución a todos nuestros problemas. La actividad de fondo es una característica problemática de este tipo de enfoque, y a menudo existe la amenaza de ahogar los datos de interés en la cacofonía del ruido experimental. En los enfoques de micromatrices para grandes volúmenes, son indispensables sistemas bien controlados; de otro modo, las diferencias observadas en la expresión génica podrían deberse, por ejemplo, a cerrar de golpe la puerta de la estufa de incubación del cultivo de tejido en lugar de ser el producto del estímulo planeado. En estas situaciones, viene a la mente la expresión "si ingresa basura, sale basura".

Evaluación de la actividad funcional

Actividad de las células fagocíticas

En el Cuadro 6-1 se resumen las principales pruebas empleadas para evaluar la función de los neutrófilos.

Capacidad de respuesta de las células dendríticas

Como comentamos en el Capítulo 1, las células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno, como macrófagos, normalmente responden a patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP) y patrones moleculares asociados con el peligro (DAMP) a través de la secreción de citocinas, así como la sobreexpresión de ligandos de la familia B7 de la superficie y moléculas de la clase II del CMH (véase la Figura 1.27). Asimismo, la estimulación por los PAMP de las células dendríticas, así como los macrófagos, suele llevar a la producción de varias citocinas como TNF, IL-1β, IL-6, IL-8, GM-CSF, IFNα, IFNβ y otros. Por lo

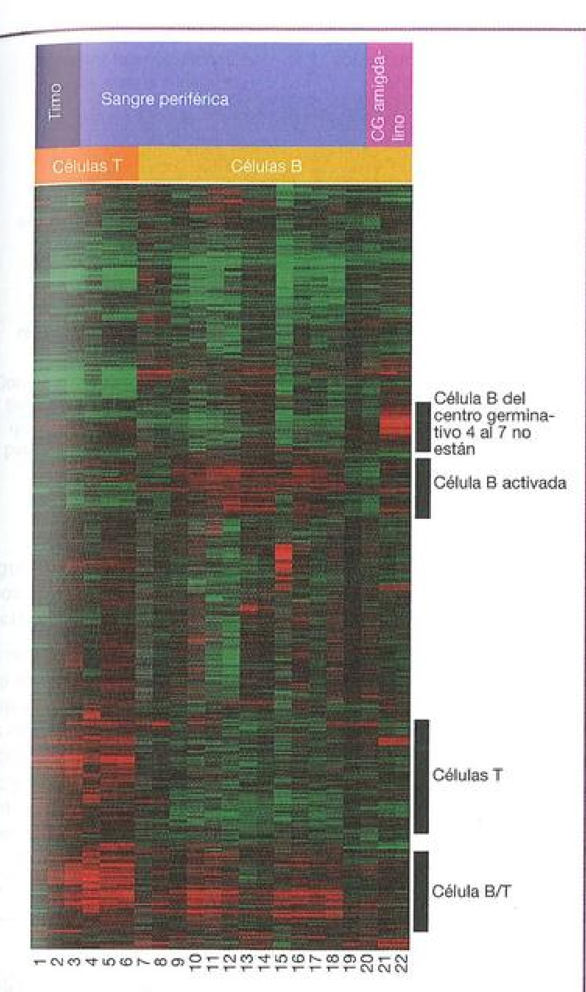


Figura 6.34. Expresión génica durante el desarrollo y la activación del linfocito.

Los datos provienen de más de 3,8 millones de mediciones de expresión génica realizada en 13.637 genes que utilizan 243 micromatrices. Cada experimento representa una población celular diferente. Por ejemplo, el experimento 1 utilizó células tímicas fetales CD4+ activadas policlonalmente, mientras que el experimento 2 muestra la misma población antes de la estimulación. Los genes sobreexpresados o inducidos están coloreados de rojo y los genes subexpresados o reprimidos aparecen de color verde. Ciertas rúbricas de la expresión génica se tornan manifiestas en poblaciones celulares diferentes, como se indica a la derecha. Por ejemplo, la rúbrica de la expresión génica de las células T incluye moléculas de señalización CD2, TCR, TCR y muchas citocinas. (Reproducido con autorización de los autores y editores de Alizadeh A.A. y Staudt L.M. [2000], *Current Opinion in Immunology* **12**, 219.)

tanto, la producción de citocinas es un ensayo conveniente de activación mediada por PAMP de las células dendríticas y los macrófagos.

Capacidad de respuesta de los linfocitos

Cuando los linfocitos son estimulados por antígeno o activadores policlonales *in vitro*, lo habitual es que sufran mitosis (véase la Figura 4.1) y liberen citocinas. La división celular suele evaluarse por la incorporación de ^{3}H-timidina o ^{125}I-UdR (5-yododesoxiuridina) en el DNA de las células en división. La división celular también se puede determinar por la incorporación de colorante lipofílico fluorescente, como CFSE (carboxi-fluorescein-succinilmidil éster) en la membrana citoplasmática de los linfocitos u otras células. Cuando las células marcadas de esta forma se dividen, el colorante fluorescente se divide por igual en cada una de las células hijas de modo que cada hija tiene sólo la mitad del contenido de colorante de la célula progenitora (Figura 6.35a). La disminución del contenido de colorante presente en la membrana puede medirse con precisión mediante un citómetro de flujo; esto brinda información acerca del número de divisiones celulares que ha experimentado una célula desde que se la marcó (Figura 6.35b). Este método es especialmente útil cuando se emplean poblaciones celulares mixtas, en las que es importante conocer el tipo celular que está en división; mediante el marcado de la membrana de células purificadas, seguido por el agregado de estas células en una población celular mixta o al inyectarlas en un animal, es posible rastrear el número de divisiones celulares posteriores que sufrieron las células marcadas de acuerdo con la determinación de su contenido de colorante.

Cuadro 6.1. Evaluación de la función de los neutrófilos

Función	Prueba
Fagocitosis	Mide la captación de partículas, como látex o bacterias, por recuento o por quimioluminiscencia
Estallido respiratorio	Mide la reducción del nitroazul de tetrazolio
Muerte intracelular	Prueba microbicida que utiliza *Staphylococcus aureus*
Migración direccional	Paso a través de filtros por el gradiente de concentración del agente quimiotáctico, como el formil.Met.Leu.Phe
Sobreexxpresión del LFA-1 y CR3 de superficie	Evaluación por tinción con anticuerpo monoclonal

Las citocinas liberadas en el medio de cultivo pueden medirse por inmunoensayo o por un bioensayo que emplee una línea celular dependiente de una citocina particular para su crecimiento y supervivencia. Las células individuales que sintetizan citocinas pueden ser cuantificadas en el citómetro de flujo mediante la permeabilización y la tinción intracelular con anticuerpos marcados; también se puede aplicar la técnica ELISPOT (véase más adelante). Como de costumbre, la biología molecular hace un valioso aporte, si bien más sofisticado, ya que las células T transfectadas con una construcción *lacZ* intensificadora de IL-2 activará la expresión de β-galactosidasa del *lac-Z* en respuesta a la citosina IL-2 (véase p. 212) y esto puede revelarse con facilidad mediante un sustrato enzimático fluorescente o cromógeno.

La capacidad de las células T citotóxicas para destruir sus células diana de modo extracelular suele evaluarse mediante un ensayo con liberación de cromo. Las células diana se marcan con ^{51}Cr y la liberación de proteína radiactiva en el medio, por encima de lo observado en los controles, representa el índice de citotoxicidad. La prueba se repite con dife-

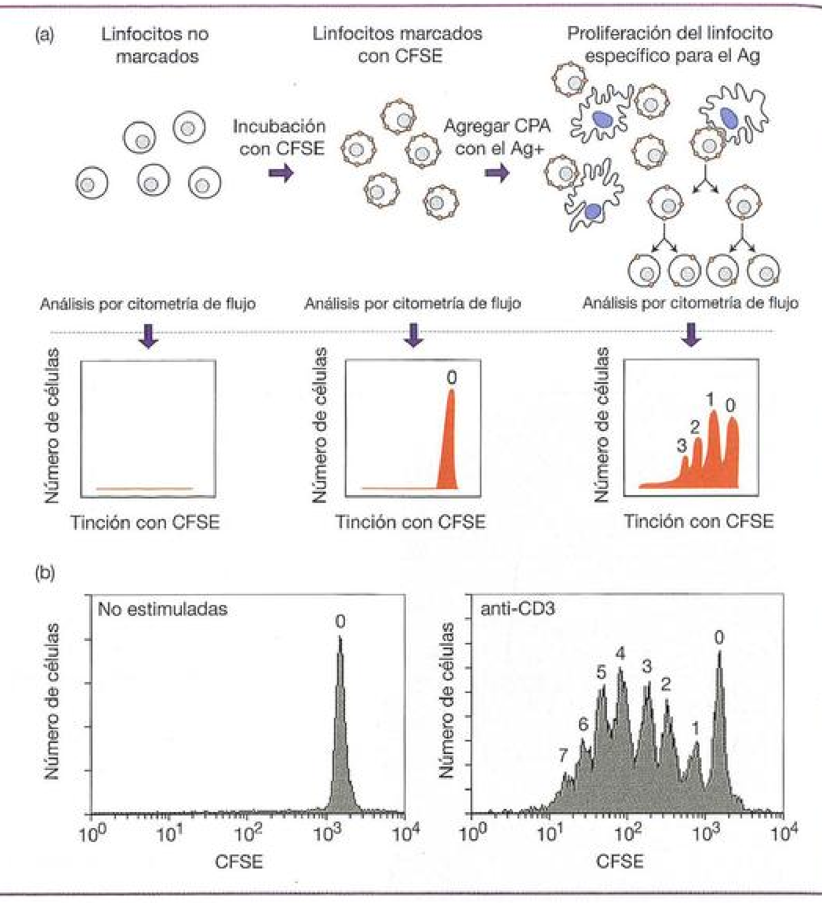


Figura 6.35. Análisis de proliferación celular mediante la marcación con CFSE.

Los linfocitos, u otras células capaces de proliferar, pueden ser marcadas con el colorante lipofílico fluorescente, CFSE, y después pueden analizarse por la distribución del colorante fluorescente en las células hijas. a) Representación esquemática de un experimento en el que se utiliza marcación con CFSE y los gráficos correspondientes obtenidos por citometría de flujo. b) Las células T periféricas humanas se marcaron con CFSE y fueron estimuladas durante 4 días con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 del II recubrimiento de la placa. Panel izquierdo: sin estimulación; panel derecho: estimulación con anti- CD3. Los números y las barras en la parte superior de cada histograma indican los respectivos picos de división y en el extremo derecho se muestra el pico de las células sin dividir. (Cortesía del Dr. Antione Attinger.)

rentes proporciones de células efectoras y células diana. Una técnica similar se utiliza para determinar la destrucción extracelular por las células NK de células diana recubiertas con anticuerpos o de células diana no recubiertas. Es necesario hacer una advertencia en lo que respecta a la interpretación de los ensayos *in vitro*. Como es posible manipular las condiciones de cultivo dentro de límites amplios, se podría lograr un resultado que tal vez no se consiga in vivo. Permítanos ilustrar este punto por la referencia a la citotoxicidad para células murinas infectadas con el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) o el virus de la estomatitis vesicular (VSV). La técnica *in vitro* que demostró ser más sensible es la que utiliza la liberación de cromo de las células diana después de la segunda estimulación de los linfocitos. Sin embargo, esto requiere 5 días, tiempo durante el cual un número relativamente pequeño de precursores de células T citotóxicas CD8 de memoria pueden reproducirse y superar el umbral exigido para obtener un ensayo mensurable. No obstante, una prueba de citotoxicidad débil en estas condiciones no se reflejó por ninguna de las evaluaciones *in vivo* de la función antiviral, lo cual implica que carecen de importancia biológica.

Detección de subpoblaciones de células T a través de la tinción para la expresión de citocinas

Durante muchos años, la producción de citocinas por poblaciones de células T se llevó a cabo a nivel de población mediante ensayos de ELISA, por ejemplo. Esto es porque las citocinas, con algunas excepciones, suelen ser secretadas rápidamente a medida que se sintetizan. Sin embargo, dos enfoques actuales hacen posible que se puedan medir directamente la producción de citocinas a nivel celular. Un enfoque utiliza inhibidores de la exportación de citocinas (p. ej., tóxicos metabólicos como brefeldina A que atrapa citocinas dentro del retículo endoplasmático) para bloquear la secreción de citocinas de modo que estas moléculas pueden ser inmunoteñidas una vez que se ha logrado la permeabilización celular. A continuación, las poblaciones de células tratadas de esta manera pueden ser **teñidas para citocinas intracelulares** mediante el empleo de anticuerpos específicos, seguido por el análisis por citometría de flujo, como se describió antes. El otro enfoque utiliza anticuerpos biespecíficos que en forma simultánea se pueden unir a un marcador de células T (como CD4) mientras que el otro Fab es específico para una citocina. En esta aplicación de la técnica, las citocinas son capturadas a medida que las células las secretan pero, debido a la naturaleza biespecífica del anticuerpo que está fijado a la superficie de la célula, la citocina también queda adherida de modo estable a la célula que la forma. Entonces, la **citocina capturada** puede ser detectada por el uso de un anticuerpo específico de una citocina diferente conjugado con un fluorocromo.

Apoptosis

La muerte celular programada es frecuente en el sistema inmunitario y tiene una importancia particular para la reso-

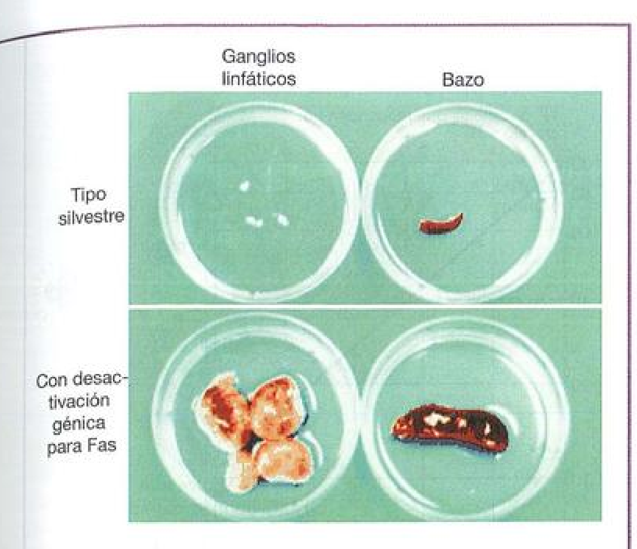


Figura 6.36. Aumento del tamaño macroscópico del bazo y los ganglios linfáticos en ratones obtenidos por desactivación génica ("*knockout*") para Fas.

Se comparan los ganglios linfáticos y el bazo de ratones de tipo silvestre y de ratones obtenidos por desactivación génica para Fas. En ambos casos, se observa que en estos animales los órganos tienen un aumento de tamaño de alrededor de 20 veces debido a la acumulación excesiva de células B y T secundaria a la falla de la deleción periférica. (Cortesía del profesor Shigekazu Nagata y adaptado de Adachi y col., 1995, *Nature Genetics* **11**, 294, con autorización.)

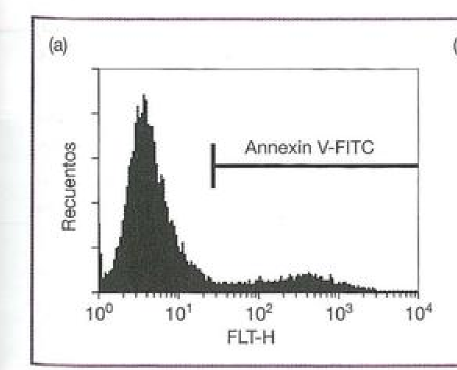
lución de las respuestas inmunitarias. La expansión clonal de las células B y T dirigida por el antígeno es seguida de la muerte de muchas de estas células en un período relativamente breve; las células restantes constituyen la población de células de memoria. La interferencia con este proceso de eliminación celular puede producir la acumulación de linfocitos susceptibles de alterar la tolerancia y producir autoinmunidad. El receptor Fas (CD95) cumple una función importante en la tolerancia periférica y el control homeostático de las poblaciones de linfocitos; la inactivación de este receptor proteico de membrana, o su ligando, causa en el ratón un gran aumento del tamaño del bazo y los ganglios linfáticos debido a la acumulación de linfocitos que normalmente se hubieran eliminado a través de la apoptosis dependiente del Fas (Figura 6.36). La ocupación del receptor Fas en linfocitos activados lleva a la inducción rápida de la apoptosis en estas células (Figura 6.7). Las células T citotóxicas también eliminan las células diana mediante la inducción de la apoptosis a través de una diversidad de estrategias. La apoptosis también es importante en la modelación de los repertorios de células B y T; la selección negativa de ambas poblaciones de linfocitos implica la activación de la apoptosis.

Se puede recurrir a diversos enfoques para medir la apoptosis, desde la evaluación morfológica (Figura 6.7) hasta las alteraciones bioquímicas de la célula que tienen lugar durante este proceso. Uno de los ensayos más utilizados se vale del hecho de que en la apoptosis la fosfatidilserina, un fosfolípido que normalmente se encuentra en la capa interna de la membrana citoplasmática, queda expuesta en la capa externa durante el proceso. Esto se detecta con facilidad empleando anexina V, una proteína de unión a la fosfatidilserina, marcada de manera fluorescente; las células apoptósicas muestran un aumento notable en su capacidad de unión a la anexina V con respecto a las células sanas (Figura 6.37).

Otros ensayos se basan en que la fragmentación extensa del DNA también es un rasgo común de la apoptosis y que puede evaluarse por electroforesis en gel de agarosa del DNA extraído de las células apoptósicas o por el ensayo TUNEL (del inglés *T*dT-mediated d*U*TP *n*ick *e*nd *l*abeling; marcado terminal del punto crítico con trifosfato de desoxiuridina), que utiliza la enzima terminal desoxinucleotidil transferasa (TdT) para agregar nucleótidos biotinilados en los extremos 3' de los fragmentos de DNA, los cuales pueden detectarse mediante el empleo de estreptavidina marcada en forma fluorescente. Durante la apoptosis, se activan varios miembros de la familia caspasa de las cisteinproteasas, y esto puede evaluarse por el análisis de inmunotransferencia (Figura 6.19) o por medio de sustratos peptídicos sintéticos marcados que pueden escindirse por acción de las caspasas.

Frecuencia del precursor

La magnitud de las respuestas de los linfocitos en cultivo está en íntima relación con la cantidad de linfocitos específicos para el antígeno que son capaces de responder. Debido a la clonalidad de las respuestas, es posible estimar la frecuencia de estos precursores específicos de antígenos por **análisis de dilución limitante**. En esencia, el método se basa en que, si se toman diversas alícuotas replicadas de una



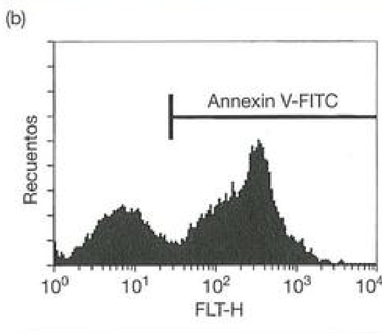


Figura 6.37. Análisis de apoptosis por marcación con anexina V.

Durante la apoptosis, la fosfatidilserina está expuesta en la capa externa de la membrana citoplasmática y esto puede detectarse con facilidad mediante el empleo de la proteína de unión a la fosfatidilserina, anexina V. a) Células T linfoblastoides humanas sin tratar, y b) células T linfoblastoides apoptósicas teñidas con anexina V conjugada con FITC. (Cortesía de la Dra. Gabriela Brumatti.)

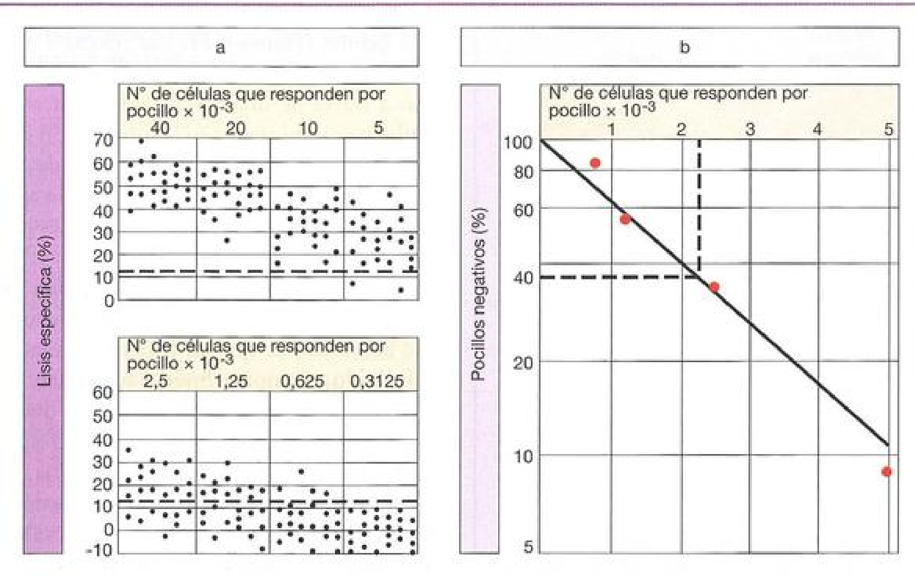


Figura 6.38. Análisis de dilución limitante de la frecuencia de precursores de células T citotóxicas en células esplénicas provenientes de un ratón BALB/c estimulado con células esplénicas irradiadas C57BL/6 como antígeno. Las células esplénicas BALB/c que responden fueron determinadas en 24 replicados para cada concentración probada junto con antígeno y un exceso de factores de células T *helper*. La citotoxicidad en cada pocillo se verificó mediante el agregado de células tumorales marcadas con ^{51}Cr (EL-4) del haplotipo C57BL/6; la citotoxicidad se reveló luego por la determinación de la liberación del material intracelular soluble marcado con ^{51}Cr en el medio. (a) Los puntos muestran el porcentaje de lisis específica de cada pocillo. La línea punteada indica tres desvíos estándares por encima del control liberado al medio, y cada punto sobre esa línea se cuenta como positivo para citotoxicidad. (b) Datos graficados de nuevo en términos del porcentaje de pocillos negativos en cada concentración de células que responden por encima de los límites en los que se titularon los datos (5×10^{-3}/pocillo a $0{,}625 \times 10^{-3}$/pocillo). La línea punteada está dibujada en el 37% de los pocillos negativos y ésta intersecta la línea de regresión para dar una frecuencia de precursores (Tcp) de 1 en 2327 células que responden. La línea de regresión tiene un valor r^2 de 1,00 en este experimento. (Reproducido con autorización de Simpson E. y Chandler P. [1986]. En Weir D.M. [ed.] *Handbook of Experimental Immunology,* Figura 68.2. Blackwell Scientific Publications, Oxford.)

suspensión celular, es dable esperar que contenga *en promedio* un precursor por alícuota; luego, el análisis de distribución de Poisson muestra que el 37% de las alícuota *no* contendrá células precursoras (a través de la aleatoriedad del muestreo). Así, si las alícuotas se realizan a partir de una serie de diluciones de una suspensión celular y se incuban en condiciones que permiten la maduración de los precursores y se reconocen mediante un esquema de amplificación, será posible saber que la dilución en la cual el 37% de las alícuotas da respuestas negativas contiene un promedio de una célula precursora por alícuota; en consecuencia, se puede calcular la frecuencia del precursor en la suspensión celular original. En la Figura 6.38 se muestra un ejemplo con cierto detalle.

Se argumentó que el análisis de dilución limitante a menudo subestima la frecuencia verdadera del precursor. Es probable que la razón se deba a que las células por lo general no sobreviven muy bien cuando se cultivan en aislamiento (es decir, una sola célula por pocillo) porque la mayoría de las células, con escasas excepciones, requiere señales de otras células para sobrevivir. Martin Raff demostró que, si faltan estas señales, las células típicamente sufren apoptosis. Una medida exacta del porcentaje de linfocitos que tiene un receptor específico para el antígeno puede obtenerse por citometría de flujo de células teñidas con el antígeno marcado. En el caso de las células B, esto es gran parte válido ya que sus receptores de antígeno reconocen el antígeno nativo. Sin embargo, sólo en los últimos tiempos esta sutileza técnica, en la forma de tetrámeros péptido-CMH, permitió aplicar esa metodología a las células T (Figura 6.39). Este enfoque supera el problema de la afinidad intrínseca relativamente débil del TCR para el péptido-CMH mediante la presentación de un péptido-CMH marcado como un tetrámero multivalente, lo cual en consecuencia aprovecha el efecto de bonificación de la multivalencia (véase p. 122). Los complejos péptido-CMH se producen al permitir el repliegue de las moléculas del CMH recombinante con el péptido sintético apropiado. Las moléculas recombinantes del CMH son biotiniladas en una extensión carboxiterminal especial, y esto asegura que la biotina sea incorporada a cierta distancia a partir del sitio en el cual se une el TCR y mezclada con estreptoavidina marcada en forma fluorescente, que no sólo se une a la biotina con una afinidad muy alta, sino que también tiene una valencia de cuatro con respecto a ésta; de ahí la formación de tetrámeros.

Están surgiendo numerosas adaptaciones de esta tecnología. Por ejemplo, la incubación a 37ºC de los tetrámeros unidos a su TCR relacionado conduce a la internalización; mediante su marcado con una toxina pueden eliminarse los linfocitos T con una única especificidad. Otro enfoque es utilizar FACS de células teñidas seleccionadas directamente en una placa de microtitulación ELISPOT, en la cual se mide la secreción de citocina; esto proporciona un análisis funcional de las células.

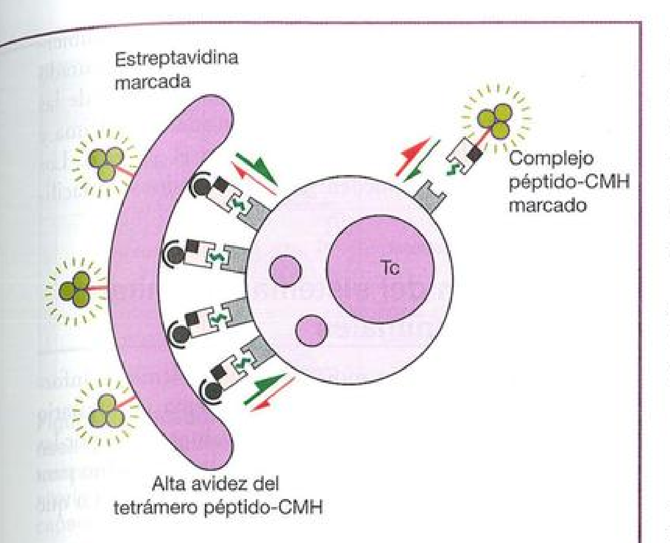


Figura 6.39. Tetrámero péptido-CMH.

Un único complejo péptido-CMH marcado con fluorocromo *(arriba a la derecha)* sólo presenta una baja afinidad para el TCR y en consecuencia proporciona una sonda insensible para su receptor. Sin embargo, la biotinilación (•) de las moléculas del CMH y la mezcla posterior con estreptavidina, que tiene una valencia de cuatro con respecto a la unión de la biotina, da lugar a un complejo tetramérico que tiene una afinidad funcional mucho más alta (avidez) cuando se utiliza una sonda para los TCR específicos en la superficie de la célula T.

Cuantificación de células formadoras de anticuerpos

Prueba de inmunofluorescencia "sándwich"

Éste es un procedimiento en doble capa ideado para visualizar el anticuerpo intracelular específico. Por ejemplo, si deseáramos ver cuántas células estaban sintetizando anticuerpos contra el polisacárido neumocócico en una preparación de tejido linfoide, primero deberíamos fijar las células con etanol para evitar que el anticuerpo sea arrastrado por el lavado durante la prueba y luego tratar el preparado con una solución del antígeno polisacárido. Después del lavado, se agrega un anticuerpo contra el polisacárido marcado con fluoresceína para localizar las células que se habían unido específicamente al antígeno.

El nombre de la prueba deriva del hecho de que el antígeno queda intercalado (sándwich) entre el anticuerpo presente en el sustrato celular y el que se agregó como segunda capa (Figura 6.8c).

Técnicas de formación de placas

Las células que secretan anticuerpos pueden cuantificarse mediante su dilución en un ambiente en el cual el anticuerpo formado por cada célula produce un efecto fácil de observar. En una técnica, desarrollada a partir del método original de Niels Jerne y Albert Nordin, las células de un animal inmunizado con eritrocitos de carnero se suspenden junto con un exceso de glóbulos rojos de carnero y complemento dentro de una cámara poco profunda formada entre dos portaobjetos. Con la incubación, las células formadoras de anticuerpos liberan su inmunoglobulina, que recubre los eritrocitos circundantes. El complemento causará la lisis de las células recubiertas y se observa como una **placa** clara de glóbulos rojos alrededor de cada célula formadora de anticuerpo (Figura 6.40). Las placas directas obtenidas de este modo revelan las células productoras de IgM, ya que este anticuerpo tiene una alta eficacia hemolítica. Para demostrar las células que sintetizan IgG es necesario incrementar la unión del complemento del complejo eritrocito-anticuerpo IgG mediante el agregado de suero de conejo anti-IgG; las "placas indirectas" así desarrolladas pueden utilizarse para cuantificar las células que elaboran anticuerpos de diferentes subclases de inmunoglobulina, siempre que se disponga del antisuero de conejo adecuado. El método

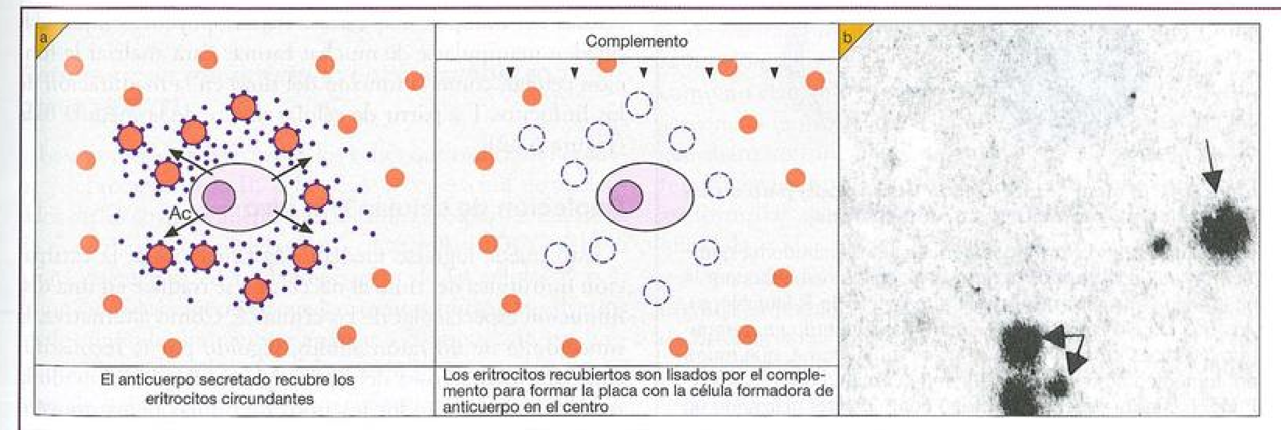


Figura 6.40. Técnica de placas de Jerne para cuantificar las células formadoras de anticuerpos (modificación de Cunningham). a) Técnica *directa* para células que sintetizan hemolisina IgM. La técnica *indirecta* para la visualización de células productoras de hemolisinas IgG requiere el agregado de anti-IgG al sistema. La diferencia entre las placas obtenidas por los métodos directo e indirecto dan el número de placas "IgG". El ensayo de *placas inversas* cuantifica las células que producen Ig total por la captura de la Ig secretada en los glóbulos rojos recubiertos con anti-Ig. El ensayo de placas múltiples se puede llevar a cabo mediante una modificación que utiliza placas de microtitulación. b) Fotografía de las placas que aparecen como superficies circulares oscuras (algunas de las cuales están indicadas con flechas) bajo iluminación con fondo oscuro. El tamaño variable depende de la afinidad del anticuerpo y la velocidad de secreción por la célula formadora de anticuerpo. (Cortesía de C. Shapland, P. Hutchings y el profesor D. Male.)

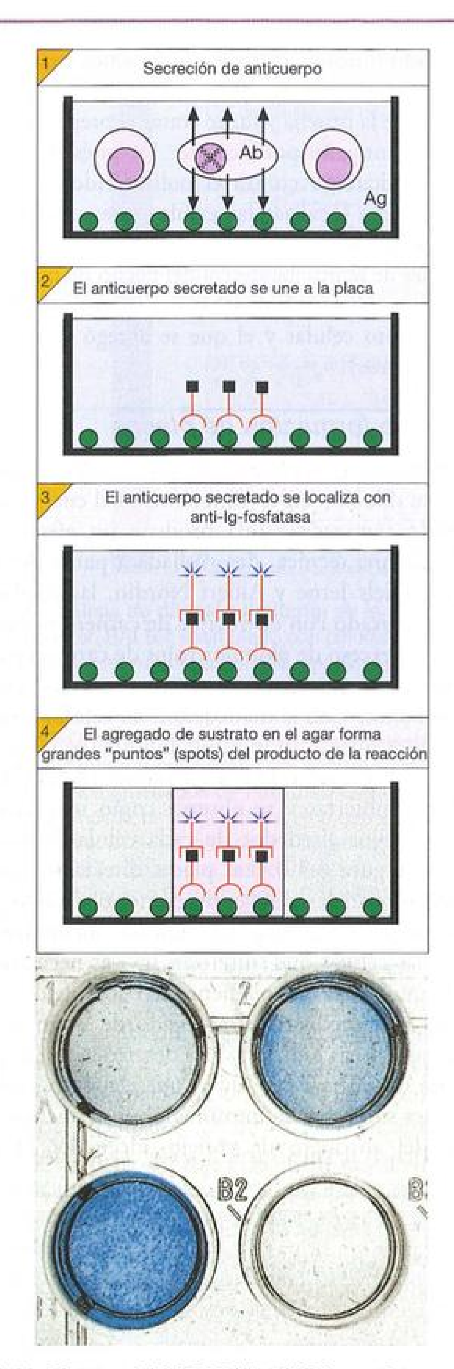


Figura 6.41. Sistema ELISPOT (de ELISA spot) para cuantificar las células formadoras de anticuerpos.

Se muestran puntos formados por células de hibridoma que elaboran autoanticuerpos contra tiroglobulina reveladas por la anti-Ig unida con fosfatasa alcalina (cortesía de P. Hutchings). A los dos pocillos superiores y al inferior izquierdo se agregaron cantidades crecientes de células de hibridoma, que muestran aumentos correspondientes en la cantidad de "ELISPOT". El pocillo inferior derecho se utilizó como control utilizando un hibridoma de especificidad irrelevante.

se puede extender recubriendo los glóbulos rojos con un antígeno como polisacárido de *Pneumococcus* o por el acoplamiento de los grupos hapteno a la superficie del eritrocito.

En la modificación **ELISPOT**, la suspensión de las células formadoras de anticuerpos se incuban en los pocillos de las placas de microtitulación que contienen filtros recubiertos con antígeno. El anticuerpo secretado es capturado localmente y se visualiza, después de la eliminación de las células, por tratamiento con anti-Ig marcada con enzima y el desarrollo de la reacción coloreada con el sustrato. Los puntos macroscópicos pueden ser cuantificados con facilidad (Figura 6.41).

Manipulación del sistema inmunitario en modelos animales

El ratón de laboratorio mostró ser increíblemente informativo para nuestra comprensión del sistema inmunitario de los vertebrados. Hay muchas maneras ingeniosas por las que se puede manipular el sistema inmunitario murino para revelar las complejidades de la función inmunitaria. Lo que sigue es una selección limitada de enfoques.

Transferencia celular adoptiva

A fin de estudiar el aislamiento particular *in vivo*, es posible utilizar dosis relativamente bajas de rayos X o radiación γ para eliminar los linfocitos endógenos, seguido por la transferencia de los linfocitos específicos para un antígeno particular. Son posibles muchas otras variaciones en este tema, como la transferencia de subpoblaciones de células T separadas, por ejemplo, las células T $CD4^+$ inmunodeplecionadas ex vivo para células que expresan CTLA-4 pueden permitir el estudio del papel de éstas en la regulación negativa de la activación de las células T.

Generación de quimeras de médula ósea

Una vez más, el punto de partida es un ratón irradiado. Los animales a los que se les destruyeron las células de este modo pueden ser reconstituidos mediante la inoculación de células madre hematopoyéticas de la médula ósea que proporcionan los precursores de todos los elementos corpusculares de la sangre (véase la Figura 11.1). Estas quimeras de células del huésped más células hematopoyéticas injertadas pueden manipularse de muchas formas para analizar la función celular, como la función del timo en la maduración de los linfocitos T a partir de células madre de la médula ósea (Figura 6.42).

Depleción de células T *in vivo*

Esto puede lograrse mediante la **timectomía**, la extirpación quirúrgica del timo al nacer, que se traduce en una disminución espectacular de las células T. Como alternativa, la timectomía de un ratón adulto, seguido por la reconstitución con médula ósea del tipo original, da por resultado la reconstitución de todos los tipos de células hematopoyéticas, excepto de las células T, debido a la función esencial del timo para el desarrollo de estas células.

Ratones mutantes espontáneos que carecen de células T

Los ratones atímicos (*nude*) homocigotos, que portan una mutación espontánea en el gen *Foxn* 1^{nu}, carecen de timo y,

	Operación	Irradiación	Restitución	Inducción de la inmunidad mediada por células
1	Timectomía simulada	X	Médula ósea	++
2	Timectomía	X	Médula ósea	–
3	Timectomía	X	Médula ósea + linfocitos adultos	++

Figura 6.42. Maduración de células madre de la médula ósea bajo la influencia del timo para tornar inmunocompetentes a los linfocitos y capaces de producir reacciones inmunitarias mediadas por células. La irradiación X (X) destruye la capacidad de los linfocitos del huésped para montar una respuesta inmunitaria celular, pero las células madre de la médula ósea inyectada pueden tornarse inmunocompetentes y restaurar la respuesta (1) a menos que se extirpe el timo (2), caso en el cual sólo los linfocitos ya inmunocompetentes son eficaces (3). Por cierto, las células madre de la médula ósea también restablecen los niveles de otros elementos figurados de la sangre (eritrocitos, plaquetas, neutrófilos, monocitos), que de otro modo disminuyen de manera notable después de la irradiación con rayos X, y esta terapéutica es crucial cuando la exposición accidental o terapéutica a rayos X u otros agentes mitóticos daña intensamente las células hematopoyéticas.

por consiguiente, carecen de células T. Estos ratones también carecen de pelo, lo que da origen a su nombre poco apropiado (*nude* significa desnudo). Además de su papel en el estudio de la inmunodeficiencia y del desarrollo de las células T, esos ratones se utilizan con frecuencia como receptores de injertos o tumores; estos ratones aceptan con facilidad tejidos de otras cepas de ratón (aloinjertos), así como de diferentes especies (xenoinjertos) debido a su falta casi total de células T necesarias para montar la respuesta de rechazo de injerto.

Ratones con inmunodeficiencia combinada grave (IDCG)

Los ratones con defectos en los genes que codifican la cadena γ del receptor para IL-2, la vía de recuperación de nucleótidos de las enzimas adenosina desaminasa o purina nucleósido fosforilasa, o las enzimas RAG, desarrollan IDCG debido a una deficiencia en la diferenciación de las células B y T. Estos animales especiales pueden reconstituirse con diversos tejidos linfoides humanos y analizar a continuación sus funciones y respuestas. La coimplantación de fragmentos contiguos de hígado fetal humano (células madre hematopoyéticas) y el timo permite la linfopoyesis T, la producción de células B y el mantenimiento de unidades formadoras de colonias del linaje mieloide y eritroide durante 6-12 meses. Las células de la sangre periférica del adulto inoculadas en la cavidad peritoneal de los ratones afectados a los que se trata con somatotropina pueden sostener la producción de células B humanas y anticuerpos, y utilizarse para generar hibridomas humanos que elaboren anticuerpos monoclonales definidos. En estos animales, también es posible evaluar las respuestas antitumorales inmunoterapéuticas.

Ingeniería genética de células y organismos usados como modelos

Inserción y modificación de genes en células de mamíferos

Dado que la transferencia de genes a células de mamíferos primarias (o sea, no transformadas) es ineficaz, se acostumbra utilizar líneas de células inmortales para estas **transfecciones** e incluir un marcador seleccionable, como la resistencia a la neomicina. Los genes pueden introducirse en las células mediante el empleo de vectores plásmidos bacterianos; sin embargo, como las células no captan con facilidad el DNA, se han desarrollado métodos para mejorar la proporción de la captación. Ésta se logra mediante la precipitación del DNA del plásmido con fosfato de calcio o electroporación, en la que se utiliza corriente eléctrica para abrir de manera transitoria los poros en la membrana citoplasmática. Otro enfoque es incorporar el plásmido en liposomas que se fusionan con la membrana celular. También resulta eficaz la microinyección directa de DNA, pero es un procedimiento muy laborioso y requiere equipo especializado. La integración del gen en el genoma de un virus, como el virus de la vacuna (vaccinia), proporciona una forma fácil de ingresar en la célula, aunque se obtienen transfecciones más estables a largo plazo con vectores retrovirales modificados. Una de las últimas novedades es la transfección por medio de la biolística, término que designa a la balística biológica. El DNA que recubre micropartículas de oro se dispara literalmente de un arma de helio de alta presión y penetra en las células; incluso las células vegetales, con sus paredes de celulosa, no escapan a esta tecnología. La piel y los tejidos expuestos quirúrgicamente también pueden ser penetrados con facilidad.

Estudiar el efecto de *agregar* un gen, entonces, no ofrece demasiados problemas técnicos. ¿Cómo se evalúa el impacto de *eliminar* un gen? Una estrategia versátil para suprimir la función del gen endógeno consiste en tratar su mRNA como un elemento distinto del gen propiamente dicho. Las secuencias de nucleótidos complementarias del mRNA del gen diana son introducidas en ésta, por lo general en una forma que les permite replicarse. Las moléculas **antisentido** así formadas aparean sus bases con el mRNA diana y bloquean la traducción en proteína. Aunque al comienzo los enfoques del RNA antisentido parecieron ser promisorios, fueron remplazados por una innovación reciente denominada **interferencia por RNA (RNAi)**.

La RNAi puede usarse para "atenuar" la expresión de determinados genes (*knockdown*) dentro de una célula mediante la introducción de una molécula de RNA de cadena doble (ds; *double strand*) homóloga al gen diana. Este método utiliza un sistema antiviral natural que se dirige selectivamente al mRNA cuando se detecta en la forma de cadena doble en la célula; en condiciones normales, el dsRNA anuncia el problema ya que esta forma de RNA rara vez está presente en las células a menos que se hallen infectadas por un virus. La maquinaria celular que naturalmente

responde al dsRNA degrada de manera selectiva sólo los mRNA que son homólogos a la molécula del dsRNA que inició la respuesta. En teoría, esto puede imitarse mediante la síntesis de una copia de dsRNA del gen que va a ser silenciado e introduciéndola en la célula; en la práctica, se presentan problemas con este procedimiento cuando se usan células de mamíferos y por ello se recurre a una estrategia alternativa (Figura 6.43). Es posible sintetizar moléculas de RNA interferente pequeño (siRNA), de 21 a 25 nucleótidos, homólogas al gen de interés y esto supera algunos de los efectos inespecíficos observados con las moléculas grandes del dsRNA. Debido a la simplicidad del enfoque del siRNA, se encuentran en proceso los análisis basados en el genoma amplio de la célula para atenuar esencialmente cada gen del genoma e investigar sus consecuencias. Sin embargo, es importante destacar que los procedimientos de atenuación génica son, si fuera posible realizarlos, 100% eficaces y siempre existe la incertidumbre de que cualquier efecto observado también podría deberse al silenciamiento involuntario de otros genes junto con el gen de interés.

Introducción de nuevos genes en animales

Creación de "ratones diseñadores" que portan nuevos genes

Los ratones hembras son inducidos a superovular y luego se los aparea. Los óvulos fecundados son microinyectados con el gen y se realiza la implantación quirúrgica en las hembras. Entre el 5 y el 40% de los ovocitos implantados se desarrollan hasta el término y, de éstos, del 10 al 25% presenta copias del gen inyectado, integradas de manera estable en sus cromosomas, que pueden detectarse por PCR. Estos animales transgénicos "fundadores" son apareados con ratones no transgénicos y, por último, se establecen líneas transgénicas puras (Figura 6.44).

La expresión del transgén puede estar dirigida a tejidos particulares si se incluye el promotor pertinente en la estructura; por ejemplo, el promotor tiroglobulina confinará la expresión a la glándula tiroides. Un enfoque diferente es activar y desactivar el gen a voluntad mediante la incorporación de un promotor inducible. Así, el promotor metalotionina sólo posibilitará la expresión de su gen unido si se agrega cinc al agua de bebida de los ratones. Es necesario confirmar que sólo se obtiene la expresión deseada ya que, en algunas situaciones, los promotores pueden comportarse de manera errónea y esto conduce a una expresión "inoportuna" del gen asociado.

Transgenes introducidos en células madre embrionarias

Las **células madre embrionarias** pueden obtenerse mediante el cultivo de la masa celular interna de los blastocitos del ratón. Después de la transfección con el gen apropiado, es posible seleccionar las células transfectadas y reim-

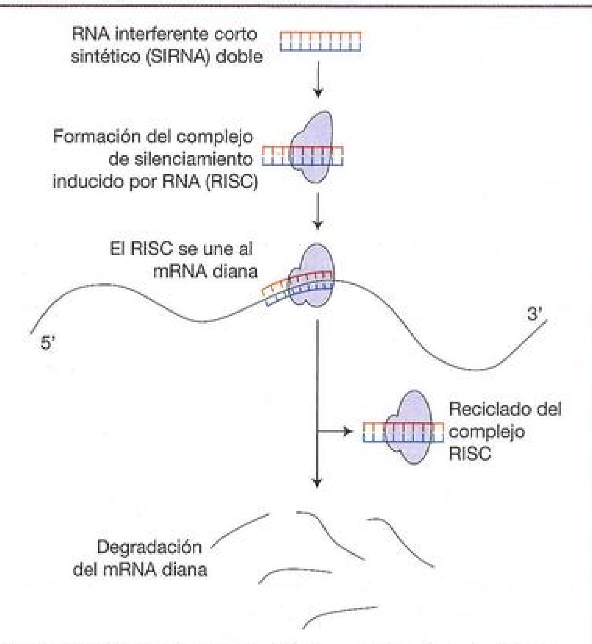


Figura 6.43. Silenciamiento génico por la vía del siRNA.

Las moléculas de RNA interferente pequeño (siRNA) de doble cadena, complementario de un gen de interés, se introducen en las células por transfección y, formando complejos con las proteínas dentro de la célula transfectada, conducen a la formación de un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC: *RNA-induced silencing complex*) que se une a una molécula de mRNA complementario para el siRNA introducido. Esto causa la degradación del mRNA diana y el reciclado del RISC a más moléculas de mRNA diana.

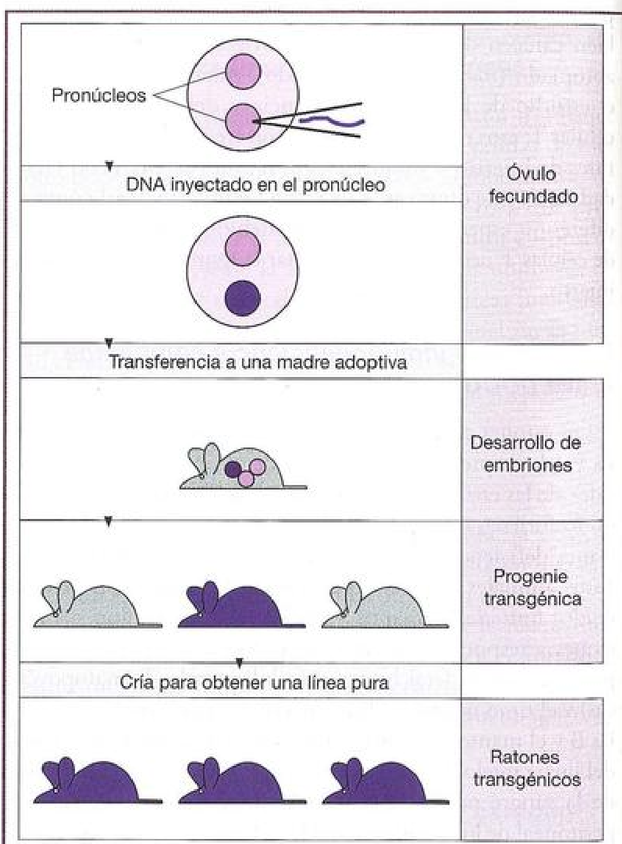


Figura 6.44. Producción de una cepa pura de ratones transgénicos por microinyección del óvulo fecundado, implantación en una madre "adoptiva" y endocría posterior.

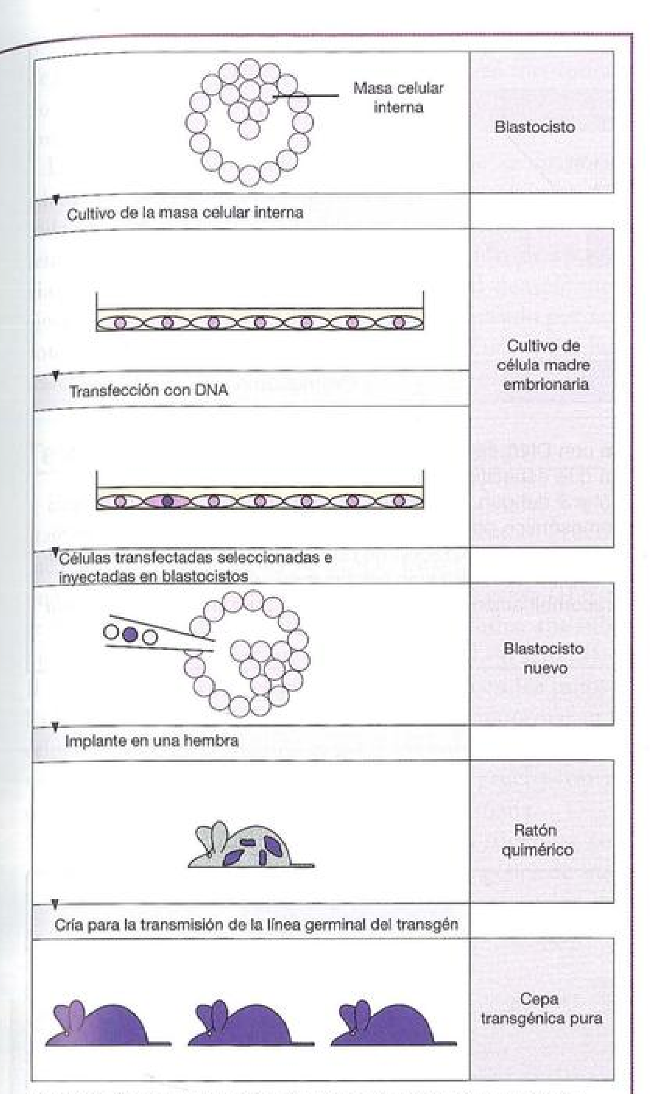


Figura 6.45. Introducción de un transgén a través de la transfección de células madre embrionarias.

Las células transfectadas pueden seleccionarse, por ejemplo, para recombinantes homólogos obtenidos por desactivaciones génicas, antes de la reimplantación.

plantadas después de la inyección en un nuevo blastocisto. Los ratones resultantes son quiméricos, es decir que algunas células portan el transgén y otras no. Lo mismo ocurre con las células germinales, y pueden producirse cepas puras engendradas por transmisión de la línea germinal del transgén (Figura 6.45).

La ventaja sobre la microinyección es que las células se pueden seleccionar después de la transfección y esto adquiere una importancia especial si se requiere una **recombinación homóloga** con el objeto de generar "**ratones con desactivación génica** (*knockout*)", carentes del gen que ha sido el objetivo del proceso. En este caso, se inserta una secuencia de DNA que romperá el marco de lectura del gen endógeno en las células madre embrionarias. Dado que la recombinación homóloga es rara en comparación con la integración al azar, los marcadores seleccionables son incorporados a la construcción con el objeto de transferir sólo aquellas células madre en las que el gen endógeno ha sido delecionado (Figura 6.46). Esta es una tecnología verdaderamente importante, y toda la comunidad biológica se ha contagiado con la fiebre del boxeo noqueando a los genes (es decir, produciendo la desactivación génica) a la derecha, a la izquierda y al centro. Sólo algunos ejemplos de ratones generados por desactivación génica de interés para los inmunólogos se enumeran en el Cuadro 6.2.

Cuadro 6.2. Algunos ejemplos de "desactivación" génica y sus efectos

Diana de la desactivación génica	Fenotipo del ratón con desactivación génica
Cadena α de CD8	Ausencia de células T citotóxicas
p59^{fynT}	Señalización defectuosa en los timocitos pero no en las células T periféricas
HOX 11	Ausencia en el bazo
Cadena α de FcεR1	Resistente a la anafilaxia cutánea y sistémica
Exón de la cadena μ de la IgM de membrana	Ausencia de células B
IL-6	Sin pérdida ósea cuando se realiza ooforectomía (¿implicación en la osteoporosis?)
IL-18	Susceptible a *Leishmania major*, cambio de la respuesta Th1 a Th2 (disminución de IFNγ y aumento de la producción de IL-4)
Aβ de la molécula de clase II del CMH	Disminución de las células T CD4; enfermedad inflamatoria intestinal
Perforina	Daño de CTL y de la función de células NK
TAP1	Falta de células CD8
TNFR-1	Resistente al shock endotóxico, sensible a *Listeria*

Modificado de Brandon (1995), *Current Bioogy* **5**, 625.

No es un hallazgo particularmente raro observar que la desactivación inesperada de un gen conduzca a defectos del desarrollo. Aunque esto en sí mismo puede proporcionar información importante relativa al papel del gen en la biología del desarrollo del animal, es posible que frustre el objetivo original del experimento. En realidad, muchos ratones generados por desactivación génica no son viables debido a la letalidad embrionaria. No teman; una vez más, el ingenio triunfa, en este caso por el servicio activo de los sistemas de recombinasas virales o de levaduras. En lugar de usar un gen no funcional para crear el ratón por desactivación génica, la construcción diana contiene la forma normal del gen pero flanqueada por las secuencias de reconocimiento (sitios *loxP*) para una enzima recombinasa denominada Cre. Estos ratones son apareados con ratones transgénicos que contienen el transgén *Cre* derivado del bacteriófago P1 unido a un promotor inducible o específico del tejido. El gen endógeno de interés será delecionado sólo en el momento y en el lugar donde se expresa Cre; en consecuencia, se crea una **desactivación génica específica de tejido** o **condicional** (Figura

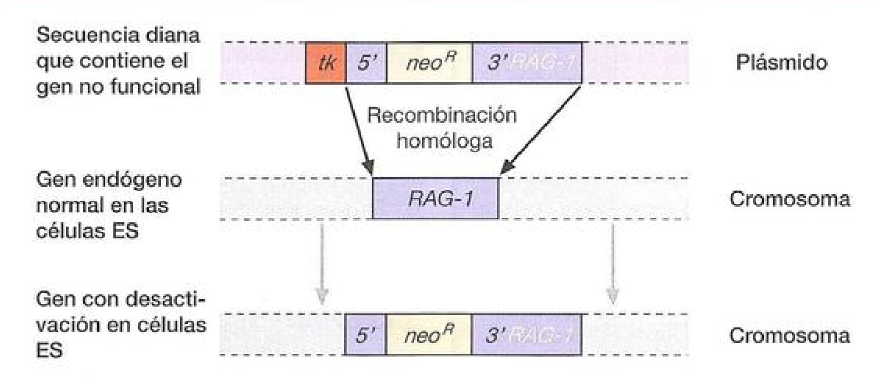


Figura 6.46. Desorganización génica por recombinación homóloga con DNA de plásmidos que contiene una copia del gen de interés (en este ejemplo *RAG-1*) en el que se insertó una secuencia que especifica resistencia a la neomicina (neo^R^), de modo similar al marco de lectura destruido RAG-1 entre los extremos 5' y 3' del gen. Las células madre embrionarias (*embryonic stem*: ES) en las cuales se incorporó la secuencia diana en el DNA cromosómico por recombinación homóloga serán resistentes al análogo G418 de la neomicina. Las células madre en las que se produjo la recombinación no homóloga en el DNA cromosómico incorporarían, además, el gen *timidina cinasa* (*tk*) que podrá utilizarse para destruir estas células mediante su cultivo en presencia de ganciclovir, que deja sólo células ES en las que se logró la recombinación homóloga. Éstas se utilizan luego para crear un ratón por desactivación génica.

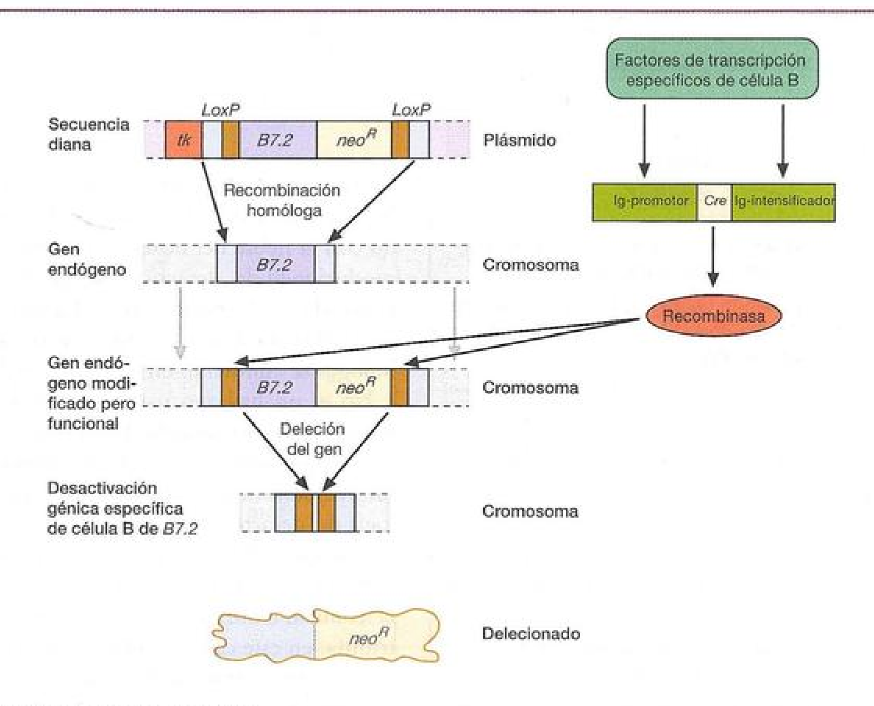


Figura 6.47. Desactivación génica condicional.

El gen endógeno en estudio (*B7-2* en este caso) es reemplazado de manera homóloga en las células madre embrionarias (ES) con un gen idéntico, como en la Figura 6.46, pero aquí flanqueado por las secuencias *LoxP* (recuadros de color castaño) y con el gen *neo*^R^ incorporado de un modo puramente no desorganizado para los propósitos de selección. Los recombinantes no homólogos contendrán el gen *tk* y son eliminados mediante el empleo de ganciclovir. Luego se generan animales transgénicos a partir de células ES resistentes a G418. Si los transgénicos *B7.2 loxP* homocigotos son cruzados con ratones que contienen un transgén para la recombinasa Cre bajo el control de elementos reguladores específicos, sólo aquellas células en las que el promotor es activo producirán la enzima Cre necesaria para delecionar la secuencia flanqueada por *loxP*. El ejemplo mencionado representaría un experimento tendiente a investigar el efecto de la desactivación génica específica *B7.2* en las células B, mientras se mantiene su expresión, por ejemplo, en las células dendríticas.

6.47). El sistema Cre/*loxP* también puede estar organizado de modo que transforme la expresión de un gen incorporando una secuencia de detención flanqueada por los sitios *loxP*.

Los ratones en los que un gen endógeno es sustituido adrede por un gen funcional, sea como una versión modificada del gen original o como un gen completamente diferente, se denominan "**ratones con sustitución de secuencia génica** (*knockin*)". En consecuencia, en el ejemplo mencionado antes, la sustitución de un gen flanqueado por *loxP* conduce finalmente a un gen desactivado en un tipo celular seleccionado.

Terapia génica en seres humanos

Parece que estamos alcanzando la ciencia ficción y en las etapas iniciales de poder corregir el infortunio genético mediante la introducción de genes "buenos". Por ejemplo, una forma de inmunodeficiencia combinada grave (IDCG) se debe a una mutación en el gen γc, que codifica una subunidad de los receptores citocina para IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. La corrección de este defecto en los niños se ha logrado con la transferencia *in vitro* del gen normal en las células madre de la médula ósea CD34+ que utiliza un vector derivado de un retrovirus Moloney, una prueba convincente del principio para la terapia génica humana.

Los problemas principales que aún deben superarse conciernen tanto a la *eficacia* de la provisión de genes de sustitución como a la *selección* del vector que proporciona el gen a la población celular deseada. Cuando es posible extraer y tratar ex vivo la población celular diana, se disminuye el riesgo de errores en la selección del objetivo para otros tejidos, pero éste no se elimina por completo. En las situaciones en las que el tejido diana no puede extraerse para el tratamiento, la eficacia de la provisión del gen puede ser deficiente. Otros riesgos son la inserción del gen de sustitución en sitios cromosómicos al azar; por ejemplo, sería sumamente indeseable la inserción en un gen supresor de tumor que pudiera conducir al desarrollo del tumor. Algunos vectores que proporcionan genes, como el virus asociado con los adenovirus (AAV), inserta en localizaciones cromosómicas predecibles y parece ser la manera de progresar en este aspecto. Aún subsiste el problema de la provisión de genes eficaces *in vitro*. Los virus representan los vehículos de aporte de genes más eficaces, ya que se adaptan perfectamente a la tarea de invadir los tejidos humanos e insertar sus genomas. No es sorprendente, entonces, que los vectores para la provisión de genes más prometedores en la actualidad se congreguen alrededor de formas modificadas de los adenovirus, AAV y lentivirus, como el HIV. Parece una ironía que el sistema inmunitario sea uno de los mayores obstáculos para la provisión eficaz de genes debido a las intensas respuestas inmunitarias generadas contra estos vectores virales. Sin embargo, algunos virus (como los AAV) sólo inducen respuestas inmunitarias leves o ineficaces que pueden explotarse, en este caso al menos, para nuestro beneficio.

RESUMEN

Elaboración de anticuerpos por encargo

- Los antisueros policlonales pueden ser generados por inmunización repetida con el antígeno.
- Los anticuerpos policlonales reconocen una mezcla de determinantes en el antígeno.
- Se requieren adyuvantes para las respuestas inmunitarias eficaces contra el antígeno.
- Las líneas de células inmortales de hibridomas que elaboran anticuerpos monoclonales proporcionan poderosos reactivos inmunológicos y conocimiento de la respuesta inmunitaria. Las aplicaciones incluyen la cuantificación de subpoblaciones de linfocitos, la depleción celular, el inmunoensayo, el diagnóstico y el estudio por imágenes del cáncer, la purificación de antígeno a partir de mezclas complejas y, recientemente, el uso de anticuerpos monoclonales como enzimas artificiales (anticuerpos catalíticos).
- Los fragmentos de anticuerpos humanos diseñados por ingeniería genética pueden obtenerse por expansión de los genes V_H y V_L a partir de donantes no inmunizados, pero con preferencia inmunizados, y que se expresan como genotecas combinatorias completamente al azar sobre la superficie del bacteriófago. Los fagos que poseen los anticuerpos de máxima afinidad son seleccionados por el enfrentamiento con antígenos y luego los genes de anticuerpos pueden ser clonados a partir de los virus aislados.
- Pueden crearse fragmentos de cadena simple de Fv (scFv) codificados por genes unidos V_H y V_L e incluso dominios únicos de la cadena pesada.
- La respuesta de anticuerpo humano antirratón (HAMA) es un obstáculo importante en el empleo de anticuerpos monoclonales murinos para propósitos terapéuticos.
- La respuesta de HAMA contra anticuerpos monoclonales murinos puede reducirse por la producción de anticuerpos quiméricos con regiones variables de los anticuerpos del ratón y regiones constantes humanas o, mejor todavía, mediante el uso de anticuerpos humanizados en los cuales todas las secuencias del ratón, salvo las CDR, son sustituidas por las secuencias humanas.
- Se utilizan ahora en clínica anticuerpos humanizados para el tratamiento de diversas enfermedades como la artritis reumatoide y el linfoma de células B.
- Pueden inmunizarse ratones transgénicos que lleven genes *Ig* humanos. Los ratones producen anticuerpos de alta afinidad totalmente humanos.
- Los anticuerpos recombinantes pueden ser expresados en gran escala en las plantas.
- Pueden utilizarse genotecas combinatorias de dianticuerpos que contienen CDR V_H H1 y H2 para desarrollar nuevos fármacos.

Purificación de antígeno y anticuerpo por cromatografía de afinidad

- Pueden utilizarse inmunosorbentes insolubles preparados por el acoplamiento del anticuerpo a Sepharose con el fin de purificar antígenos por afinidad a partir de mezclas complejas y a la inversa, para purificar anticuerpos.
- La cromatografía de afinidad también puede ser usada para copurificar proteínas que sirven como pares de unión de antígenos.

Modulación de la actividad biológica por los anticuerpos

- Los anticuerpos pueden detectarse por inhibición de las funciones biológicas como infectividad viral o crecimiento bacteriano.
- La inhibición de la función biológica por anticuerpos conocidos ayuda a definir la función del antígeno, sea, por ejemplo, una hormona o una citocina, en respuestas complejas *in vitro* o *in vitro*.
- Los anticuerpos que estimulan al receptor o forman enlaces cruzados con éste y producen la activación de la función biológica pueden sustituir al ligando natural y es posible utilizarlos para investigar la función biológica *in vitro* o *in vitro*.

Inmunodetección de antígeno en las células y en los tejidos

- Los anticuerpos pueden utilizarse como sondas altamente específicas para detectar la presencia de antígeno en un tejido y para investigar la localización subcelular del antígeno. Los antígenos pueden localizarse si se tiñen mediante anticuerpos fluorescentes y se observan en un microscopio de fluorescencia.
- La fijación y la permeabilización de las células permiten el ingreso de anticuerpos y la detección de antígenos intracelulares.
- El microscopio confocal permite examinar un plano muy delgado con gran aumento y obtener datos cuantitativos en imágenes extremadamente nítidas de las estructuras que contiene el antígeno; también pueden examinarse en tres dimensiones.
- Los anticuerpos se pueden marcar directamente o visualizarse mediante un segundo anticuerpo, una anti-Ig marcada.
- Marcaciones fluorescentes diferentes pueden conjugarse con anticuerpos secundarios para permitir la detección simultánea de varios antígenos distintos en la misma célula.
- La citometría de flujo es un medio altamente cuantitativo de detectar fluorescencia asociada con células inmunomarcadas o marcadas con colorante; mediante esta técnica se pueden analizar miles de células por minuto.
- En un citómetro de flujo, se investigan células únicas en gotas individuales mediante el empleo de uno o más rayos de láser y pueden registrarse los datos cuantitativos que utilizan diferentes marcadores fluorescentes, lo cual da un análisis fenotípico complejo de cada célula en una mezcla heterogénea. Además, la dispersión frontal de la luz del láser define el tamaño celular, y la dispersión a 90°, la granularidad celular.
- También pueden utilizarse anticuerpos fluorescentes o sus fragmentos para teñir antígenos intracelulares en las células permeables. Se dispone asimismo de sondas para pH, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, tioles y contenido de DNA.
- Los anticuerpos pueden ser marcados enzimáticamente para la definición histoquímica de antígenos con el microscopio óptico o acoplados con partículas de oro coloidal de diferentes tamaños para la visualización ultraestructural en el microscopio electrónico.

Detección y cuantificación de antígenos por anticuerpos

- Las concentraciones sumamente bajas de antígenos pueden determinarse por técnicas de inmunoensayo, que dependen de la relación entre la concentración de Ag y la ocupación fraccional del anticuerpo que se une. Los sitios ocupados se determinan con un segundo anticuerpo de actividad altamente específica, dirigido contra un epítopo diferente; de manera alternativa, los sitios desocupados pueden estimarse por Ag marcado.
- Los antígenos pueden ser separados sobre la base de la masa molecular por electroforesis a través de geles de poliacrilamida. Los antígenos separados de esta manera se pueden transferir sobre membranas de PVDF o nitrocelulosa y su presencia es detectada mediante sondas con anticuerpos adecuados.
- Los antígenos y las moléculas asociadas con antígeno pueden ser inmunoprecipitados utilizando anticuerpos que reconocen el antígeno en su forma nativa.
- Las concentraciones más altas de antígenos con frecuencia se estiman por nefelometría.
- Las micromatrices de proteínas, que contienen miles de proteínas inmovilizadas sobre un soporte sólido, pueden determinarse con sondas de anticuerpos para la detección simultánea de muchos antígenos. De la misma manera, las micromatrices de anticuerpos pueden ser utilizadas para determinar la presencia de antígenos múltiples en una sola muestra.

Mapeo de epítopos

- Los nidos superpuestos de péptidos provenientes de la secuencia lineal de una proteína sirven para elaborar mapas de epítopos de células T y elementos lineales de los epítopos de células B. Los bacteriófagos que codifican todos los hexapéptidos posibles en su superficie proporcionaron un éxito limitado en la identificación de determinantes discontinuos de células B.

Estimación de anticuerpos

- El contenido de anticuerpos de un antisuero policlonal se define en su totalidad en términos operativos por la naturaleza del análisis empleado.
- Los anticuerpos no precipitantes pueden determinarse por nefelometría con láser o por sales o coprecipitación de la anti-Ig con antígeno radioactivo.

- La afinidad se determina por diversos métodos, como la resonancia de plasmón superficial, que da una medida de las proporciones de asociación y disociación.
- Los anticuerpos también pueden detectarse por aglutinación macroscópica de partículas recubiertas por el antígeno y por uno de los métodos más importante, ELISA, un procedimiento en dos fases en el que el anticuerpo unido al antígeno en fase sólida es detectado por una anti-Ig ligada a una enzima.

Aislamiento de subpoblaciones de leucocitos

- Las células pueden separarse sobre la base de características físicas, como tamaño, densidad de flotación y adhesividad.
- Las células fagocíticas pueden separarse con un imán después de la captación de partículas de hierro, y las células que se dividen en respuesta a un estímulo específico, por ejemplo, antígeno, pueden ser eliminadas por la luz ultravioleta después de la incorporación de 5-bromodesoxiuridina.
- Las células recubiertas con anticuerpo pueden eliminarse por citotoxicidad mediada por anticuerpos o conjugados anti-Ig-ricina; pueden ser aisladas por el enfrentamiento con anti-Ig en fase sólida o por formación de cúmulos con cuentas magnéticas que poseen anti-Ig en su superficie.
- Cantidades más pequeñas de células pueden ser fraccionadas cubriéndolas con un anticuerpo monoclonal fluorescente y separándolas de las células no fluorescentes en el FACS.
- Las células T específicas del antígeno pueden ser enriquecidas como líneas o clones mediante la estimulación con el antígeno; la fusión apropiada a líneas de células T tumorales produce hibridomas de células T inmortales específicos de antígeno.

Análisis de expresión génica

- La expresión del mRNA puede analizarse por inmunotransferencia Northern o RT-PCR.
- Un cuadro completo de la expresión génica celular es ahora asequible mediante hibridación con micromatrices de DNA.

Evaluación de la actividad funcional

- Las respuestas de linfocitos al antígeno pueden ser monitorizadas mediante la proliferación, la liberación de citocina o ambas. La proliferación se determina por la captación de ^{3}H-timidina o CFSE marcado.
- Las células que secretan citocinas se pueden identificar mediante la técnica ELISPOT, en la cual el producto secretado es capturado por un anticuerpo en fase sólida y luego teñido con un segundo anticuerpo marcado.
- La destrucción extracelular por las células T citotóxicas y las células NK puede ser determinada por la liberación de ^{51}Cr radioactivo a partir de las células diana premarcadas.
- La apoptosis puede medirse mediante la evaluación de la unión a la anexina V que detecta la externalización de fosfatidilserina en la capa externa de la membrana citoplasmática de las células apoptósicas.
- La frecuencia del precursor de células T efectoras se puede medir por la tinción de las células con tetrámeros péptido-CMH o por análisis de dilución limitante.
- Las células formadoras de anticuerpos pueden cuantificarse mediante una prueba sándwich de inmunofluorescencia o con técnicas de formación de placas, en las que el anticuerpo secretado por las células causa la lisis mediada por complemento de los glóbulos rojos adyacentes o es capturado por el antígeno en fase sólida en un ensayo ELISPOT.
- La actividad funcional se puede evaluar con experimentos de reconstitución celular en los que conjuntos de leucocitos y tejido linfoide seleccionado pueden ser trasplantados en huéspedes que no responden, como receptores irradiados o ratones con inmunodeficiencia combinada grave. También pueden separarse poblaciones celulares definidas y recombinadas de manera selectiva *in vitro*.
- Los anticuerpos pueden utilizarse para la investigación de la función celular por entrecruzamiento de los componentes de la superficie celular o por destrucción selectiva de sitios intracelulares particulares por irradiación con láser de anticuerpos específicos conjugados con cromóforos que se localizan en el área diana por la penetración de células permeabilizadas.

Ingeniería genética de células

- Los genes pueden ser insertados en células de mamífero por transfección utilizando precipitados de fosfato de calcio, electroporación, liposomas y microinyección.
- Los genes también pueden ingresar en una célula después de la incorporación en virus de la vacuna o retrovirus.
- La función génica endógena puede ser inhibida por RNA antisentido, interferencia por RNA, RNA interferente pequeño o por recombinación homóloga con un gen desintegrado.
- Los ratones transgénicos que portan un gen completamente nuevo introducido en un óvulo fecundado por microinyección de DNA pueden establecerse como líneas endocriadas.
- Los genes pueden ser introducidos en células madre embrionarias; estas células madre modificadas son inyectadas de nuevo en un blastocisto y pueden desarrollar ratones fundadores a partir de los cuales es posible criar animales transgénicos puros. Una aplicación muy importante de esta técnica consiste en la rotura de un gen diana en la célula madre embrionaria por recombinación homóloga, lo cual produce "ratones con desactivación génica" (*knockout*), que carecen de un gen específico. Las desactivaciones génicas condicionales emplean sistemas de recombinasas como Cre/*loxP* para controlar la deleción temporariamente o de una manera específica del tejido.
- Los **ratones con sustitución de secuencia génica** (*knockin*)" tienen un gen endógeno especificado de modo homólogo que es sustituido con una variante de ese gen o un gen completamente diferente.

- El futuro de la terapia génica humana es muy promisorio, pero se deben superar obstáculos fundamentales relacionados con la provisión segura y eficaz de los genes terapéuticos. La provisión de genes por vectores, basados en retrovirus o en virus relacionados con los adenovirus, se encuentra bajo intensa investigación.
- Las respuestas inmunitarias potentes contra muchos vectores virales reducen su utilidad como vehículos para la provisión de genes.

LECTURAS ADICIONALES

Alkan S.S. (2004) Monoclonal antibodies: the story of a discovery that revolutionized science and medicine. Nature Reviews Immunology 4, 153–156.

Altman J.D. & Davis M.M. (2003) MHC–peptide tetramers to visualize antigen-specific T cells. Current Protocols in Immunology Chapter 17, Unit 17.3, John Wiley & Sons.

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. & Struhl K. (eds.) (2010) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley, New York.

Bonifacino J.S., Dasso M., Harford J.B., Lippincott-Schwartz J. & Yamada K.M. (eds.) (2010) Current Protocols in Cell Biology. John Wiley, New York.

Brandtzaeg P. (1998) The increasing power of immunohistochemistry and immunocytochemistry. Journal of Immunological Methods 216, 49–67.

Brannigan J.A. & Wilkinson A.J. (2002) Protein engineering 20 years on. Nature Reviews Molecular and Cell Biology 3, 964–970.

Carter L.L. & Swain S.L. (1997) Single cytokine analysis of cytokine production. Current Opinion in Immunology 9, 177–182.

Cavazzana-Calvo S. et al. (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-XI disease. Science 288, 669–672.

Chatenoud L. (2003) CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside. Nature Reviews Immunology 3, 123–132.

Chowdhury P.S. & Pastan I. (1999) Improving antibody affinity by mimicking somatic hypermutation in vitro. Nature Biotechnology 17, 568–572.

Coligan J.E., Bierer B.E., Margulies D.H., Shevach E.M. & Strober W. (eds.) (2010) Current Protocols in Immunology. John Wiley, New York.

Collas P. (2009) The state-of-the-art of chromatin immunoprecipitation. Methods Mol Biol. 567, 1–25.

Delves P.J. (1997) Antibody Production. J. Wiley & Sons, Chichester.

Fishwild D.M. et al. (1996) High-avidity human IgGk monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. Nature Biotechnology 14, 845–851.

Friguet B., Chafotte A.F., Djavadi-Ohaniance L. & Goldberg M.E.J. (1985) Measurements of the true affinity constant in solution of antigen–antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of Immunological Methods 77, 305–319.

George A.J., Lee L. & Pitzalis C. (2003) Isolating ligands specific for human vasculature using in vivo phage selection. Trends in Biotechnology 5, 199–203.

Green L.L. (1999) Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: xenomouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. Journal of Immunological Methods 231, 11–23.

Huppi K., Martin S.E. & Caplen N.J. (2005) Defining and assaying RNAi in mammalian cells. Molecular Cell 17, 1–10.

Lacroix-Desmazes S. et al. (1999) Catalytic activity of antibodies against factor VIII in patients with hemophilia A. Nature Medicine 5, 1044–1047.

Lefkovits I. & Waldmann H. (1999) Limiting Dilution Analysis of Cells of the Immune System, 2nd edn. Oxford University Press, Oxford.

Letsch A. & Scheibenbogen C. (2003) Quantification and characterization of specific T-cells by antigen-specific cytokine production using ELISPOT assay or intracellular cytokine staining. Methods 31, 143–149.

Liu M. et al. (2004) Gene-based vaccines and immunotherapeutics. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 101, Suppl. 2, 14567–14571.

Martin S.J. Ed. (2008) Apoptosis. Methods 44, 197–285.

Malik V.S. & Lillehoj E.P. (1994) Antibody Techniques. Academic Press, London. [Laboratory manual of pertinent techniques for production and use of monoclonal antibodies for the nonimmunologist.]

McGuinness B.T. et al. (1996) Phage diabody repertoires for selection of large numbers of bispecific antibody fragments. Nature Biotechnology 14, 1149–1154.

Monroe R.J. et al. (1999) RAG2:GFP knockin mice reveal novel aspects of RAG2 expression in primary and peripheral lymphoid tissues. Immunity 11, 201–212.

Mosier D.E. (ed.) (1996) Humanizing the mouse. Seminars in Immunology 8, 185–268.

Ogg G.S. & McMichael A.J. (1998) HLA–peptide tetrameric complexes. Current Opinion in Immunology 10, 393–396.

Pinilla C. et al. (1999) Exploring immunological specificity using synthetic peptide combinatorial libraries. Current Opinion in Immunology 11, 193–202.

Robinson J.P. & Babcock G.F. (eds.) (1998) Phagocyte Function: A Guide for Research and Clinical Evaluation. Wiley-Liss, New York.

Sambrook J. & Russell D.W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Shabat D., Rader C., List B., Lerner R.A. & Barbas C.F., III (1999) Multiple event activation of a generic prodrug trigger by antibody catalysis. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 96, 6925–6930.

Storch W.B. (2000) Immunofluorescence in Clinical Immunology: A Primer and Atlas. Birkhäuser Verlag AG, Basel.

Vaughan T.J. et al. (1996) Human antibodies with subnanomolar affinities isolated from a large nonimmunized phage display library. Nature Biotechnology 14, 309–314.

Weir D.M. et al. (eds.) (1996) Handbook of Experimental Immunology, 5th edn. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Zola H. (1999) Monoclonal Antibodies. Bios Scientific Publishers, Oxford.

CAPÍTULO 7

Bases anatómicas de la respuesta inmunitaria

Conceptos clave

A modo de resumen...

Las respuestas inmunitarias adquiridas están mediadas por linfocitos específicos para el antígeno. La frecuencia de la población de cada especificidad es baja, y por lo tanto, los clones importantes de los linfocitos son seleccionados por el antígeno para expandirse en cuanto al número por intensa proliferación. Las células T citotóxicas y la mayoría de las células B, ambas específicas para el antígeno, necesitan de la colaboración de las células T *helper* antigenoespecíficas. Además, las células T *helper* $CD4^{+}$ requieren que el antígeno les sea presentado por las células presentadoras de antígeno profesionales con moléculas de clase II del CMH. Estas interacciones celulares estrictas exigen que, a diferencia de las respuestas innatas, las respuestas inmunitarias adquiridas sean iniciadas en un ambiente altamente estructurado.

Introducción

Una respuesta inmunitaria eficaz es el resultado de una serie intrincada de acontecimientos celulares. El antígeno debe ser detectado por las

Introducción *(continuación)*

células presentadoras de antígeno y, después, ser procesado por éstas; las células presentadoras de antígeno deben establecer contacto y activar las células T *helper* para estimular a las células B y a los precursores de las células T citotóxicas. Además, se requieren varios factores, como citocinas, para sostener la proliferación de linfocitos y provocar la diferenciación celular. Asimismo, se deben formar células de memoria para las respuestas secundarias, y la totalidad de la respuesta debe estar coordinada de modo que sea suficiente, pero no excesiva, y apropiada al tipo de infección en cuestión. Las complejas interacciones celulares que forman la base de la respuesta inmunitaria tienen lugar dentro de la arquitectura organizada del tejido linfoideo secundario, que incluye los ganglios linfáticos, el bazo y el tejido no encapsulado que reviste el aparato respiratorio, el tubo digestivo y el aparato genitourinario.

Tejido linfoide organizado

Los linfocitos derivan de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea. Aunque las células B maduran completamente en la **médula ósea**, los precursores de las células T deben salir de la médula ósea y viajar a través de la sangre hacia el **timo**, donde se desarrollan en células T maduras (Figura 7.1). Como se trata de localizaciones en las que se producen los linfocitos, se denominan **órganos linfoides primarios**. La función de la médula ósea en la hematopoyesis y del timo en el desarrollo de las células T se describirá en el Capítulo 11, mientras que la función de la médula ósea como un sitio importante de producción de anticuerpos se describe más adelante en este capítulo.

Los **órganos linfoides secundarios** y los tejidos son las localizaciones en las que se generan las respuestas inmunitarias adquiridas. Estos tejidos, los **ganglios linfáticos**, el **bazo** y el tejido linfoide asociado a mucosas (**MALT**) se pueblan de macrófagos, células dendríticas y linfocitos. En esencia, los ganglios linfáticos reciben el antígeno ya sea porque drenan directamente de los tejidos o porque es transportado por las células dendríticas con moléculas de clase II$^+$ del CMH. El bazo controla la sangre, y el tejido linfoide no encapsulado de los MALT está integrado estratégicamente en las superficies mucosas del cuerpo como un sistema defensivo de vanguardia basado en la secreción de IgA.

En la Figura 7.2 se muestra la disposición anatómica de estos tejidos linfoides. Los linfáticos y los ganglios linfáticos asociados forman una compleja red que drena el líquido (linfa) de los tejidos corporales y retorna a la sangre a través del conducto torácico (Figura 7.3).

La comunicación entre estos tejidos y el resto del organismo se mantiene por un conjunto de linfocitos recirculantes, que pasan desde la sangre a los ganglios linfáticos, el bazo y otros tejidos, y nuevamente a la sangre a través de los vasos linfáticos mayores como el conducto torácico (Figuras 7.4 y 7.12).

Circulación de linfocitos entre los tejidos linfoides

La circulación de linfocitos entre los tejidos, el torrente sanguíneo y los ganglios linfáticos permite que las células

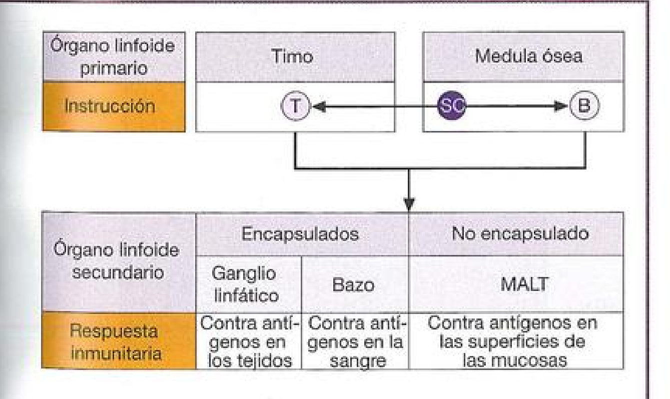


Figura 7.1. Organización funcional del tejido linfoide.

Las células madre hematopoyéticas (*stem cells*, SC) que se originan en la médula ósea se diferencian en células T y B inmunocompetentes en los órganos linfoides primarios y luego colonizan los tejidos linfoides secundarios, donde se organizan las respuestas inmunitarias. El tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), junto con colecciones difusas de células de la lámina propia y los pulmones, produce anticuerpos para las secreciones de las mucosas.

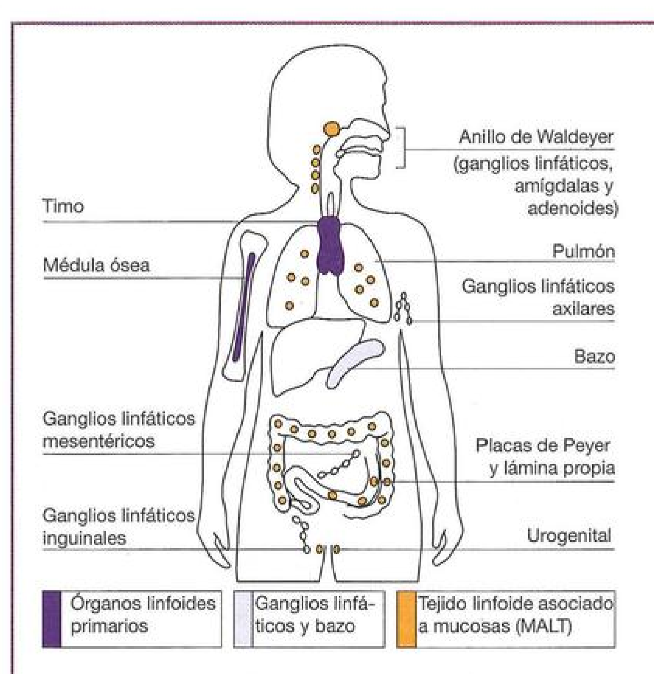


Figura 7.2. Distribución de los principales órganos y tejidos linfoides en el cuerpo.

sensibles a los antígenos los busquen y sean reclutadas en sitios en los cuales se está desarrollando una respuesta, mientras que la diseminación de las células de memoria y su progenie permite organizar una respuesta más amplia en todo el sistema linfoide. Así, en el curso de las 24 horas posteriores a la localización primaria del antígeno en los ganglios linfáticos o el bazo, se produce una reducción drástica de células reactivas al antígeno entre los linfocitos circulantes; varios días después, tras su proliferación en el sitio de localización del antígeno, se observa un pico máximo de células activadas en el conducto torácico. Cuando el antígeno llega a un ganglio linfático de un animal estimulado causa una disminución notable de la producción de células en los linfáticos eferentes, fenómeno denominado "cese celular" o "atrapamiento de linfocitos". Este proceso implica una reducida capacidad de respuesta de los linfocitos a la esfingosina 1-fosfato (S1P), una molécula que indica a los linfocitos su salida de los ganglios linfáticos. Esta fase de cese es seguida de una salida de células activadas que alcanza un máximo alrededor de las 80 horas.

Los linfocitos vírgenes se asientan en los ganglios linfáticos

Los linfocitos vírgenes ingresan en un ganglio linfático ya sea a través de los linfáticos aferentes o por el pasaje guiado a través del **endotelio especializado de pared alta de las vénulas poscapilares** (Figura 7.5). Si arriban por las vénulas capilares de endotelio alto (HEV), su ingreso está determinado por una serie de **receptores de asentamiento *(homing)* sobre los linfocitos** que comprende la molécula LFA-1 ($\alpha_1\beta_2$, Cuadro 7.1) de la superfamilia de las **integrinas**, la selectina L de la familia de las selectinas y el receptor de quimiocina CCR7. Sus ligandos complementarios sobre

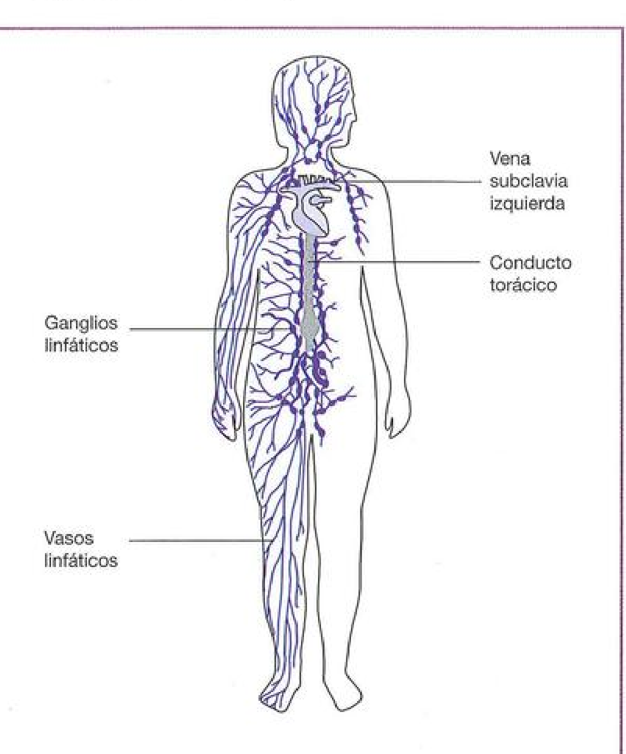


Figura 7.3. Red de ganglios y vasos linfáticos.

Los ganglios linfáticos aparecen en las uniones de los linfáticos de drenaje. Finalmente, la linfa se acumula en el conducto torácico y desde éste retorna al torrente sanguíneo a través de la vena subclavia izquierda.

Figura 7.4. Tráfico y recirculación de linfocitos a través del tejido linfoide encapsulado y los sitios de inflamación.

Los linfocitos transportados por la sangre ingresan en los tejidos y los ganglios linfáticos atravesando el endotelio de paredes altas de las vénulas poscapilares (HEV) y salen por los linfáticos de drenaje. Los linfáticos eferentes confluyen para formar el conducto torácico por el que retornan los linfocitos a la circulación sanguínea. En el bazo, que carece de HEV, los linfocitos ingresan en el área linfoide *(pulpa blanca)* desde las arteriolas, pasan hacia los sinusoides del área eritroide *(pulpa roja)* y salen por la vena esplénica. El paso a través del sistema inmunitario de las mucosas se muestra en la Figura 7.12.



Figura 7.5. Vénula endotelial de paredes altas (HEV).

Microfotografía electrónica por barrido de ganglio linfático mesentérico de rata que muestra los linfocitos laxamente agrupados alrededor de una HEV *(azul)* y vasos linfáticos *(amarillo)*. (El elemento negro en la parte superior de la HEV es un artefacto en el que desapareció una tributaria de la HEV durante la preparación.) El ganglio linfático fue cortado con un vibrátomo que elimina gran parte de los linfocitos libres de la luz de la HEV y de los vasos linfáticos. Escala barra = 20μm. La microfotografía fue gentilmente proporcionada por O. Ohtani.

Cuadro 7.1. Superfamilia de las integrinas. En general, las integrinas están vinculadas con la adhesión intercelular y la adhesión a los componentes de la matriz extracelular. Muchos miembros participan en la embriogénesis, el crecimiento celular, la diferenciación, la motilidad, la muerte celular programada y el mantenimiento tisular. Muchas integrinas intervienen en la transducción de señales celulares. Son heterodímeros $\alpha\beta$ seleccionados de 18 cadenas α y 8 cadenas β que se aparean para formar 24 combinaciones diferentes. Una estructura denominada dominio I (insertado) se presenta en muchas subunidades de integrinas y contiene el sitio de adhesión dependiente de iones metálicos (*"metal ion-dependent adhesión site"*, MIDAS), que en presencia de Mg^{2+} participa en la fijación del motivo Arg.Gly.Asp. (RGD) sobre muchos de los ligandos esenciales para la adhesión celular. El ligando MFG-E8 de la integrina $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ es expresado por varios tipos celulares, como IDC y macrófagos en los tejidos linfoides secundarios donde participa en la fagocitosis de las células B apoptósicas. LAP se une a TGFβ y por consiguiente inhibe su actividad.BSP, sialoproteína ósea; CO, colágeno; CR3, receptor 3 del complemento; DEL-1, locus 1 del desarrollo endotelial; FG, fibrinógeno; FN, fibronectina; FX, factor X; GPIIb/IIIa, glucoproteínas integrina IIb y IIIa; ICAM, molécula de adhesión intercelular; IDC, célula dendrítica interdigitada; IEL, linfocito intraepitelial; JAM-1, molécula de adhesión de unión-1; LAP-TGFβ, complejo del factor transformador del crecimiento b y el péptido asociado a la latencia; LFA, molécula asociada a la función de los leucocitos; LM, laminina; LPAM, molécula de adhesión a la placa de Peyer linfocítica; Mac, macrófago; MAdCAM, **molécula de adhesión celular de adresina de la mucosa**; MFG-E8; factor de crecimiento epidérmico 8 de los glóbulos grasos de la leche; MMP, metaloproteinasa de la matriz; Mo, monocito; N, neutrófilo; NK, célula *natural killer*; NN, nefronectina; OR osteopontina; THR, trombospondina; TN, tenascina; VCAM, **molécula de adhesión celular vascular**; VLA, **antígeno muy tardío** (¡aunque no todos se expresan tardíamente!); VN, vitronectina; VWF, factor de von Willebrand. *Los marcadores CD se explican en la p. 284.

Integrina	Designación CD	Expresión	Ligando
$\alpha_1\beta_1$ (VLA-1)	CD49a/CD29	Amplia	CO, LM
$\alpha_2\beta_1$ (VLA-2)	CD49b/CD29	Amplia	CO, LM, THR
$\alpha_3\beta_1$ (VLA-3)	CD49c/CD29	Amplia	LM, THR
$\alpha_4\beta_1$ (VLA-4)	CD49d/CD29	Amplia	CD14, FN, MAdCAM-1, OP, THR, VCAM-1
$\alpha_5\beta_1$ (VLA-5)	CD49e/CD29	Amplia	FN, OP
$\alpha_6\beta_1$ (VLA-6)	CD49f/CD29	Amplia	LM
$\alpha_7\beta_1$	-/CD29	Amplia	LM
$\alpha_8\beta_1$	-/CD29	Amplia	FN, OP, TN, VN
$\alpha_9\beta_1$	-/CD29	Amplia	OP, TN, VECAM-1
$\alpha_{10}\beta_1$	-/CD29	Amplia	CO, LM
$\alpha_{11}\beta_1$	-/CD29	Musculoesquelética	CO
$\alpha_v\beta_1$	CD51/CD29	Mayoría de los leucocitos	FN, LAP-TGFβ, OP
$\alpha_L\beta_2$ (LFA-1)	CD11a/CD18	Mayoría de los leucocitos	ICAM-1,-2,-3, -4, JAM-1
$\alpha_M\beta_2$ (CR3 [Mac-1])	CD11b/CD18	N, MØ, Mac	C3bi, FG. FX, ICAM-1, -4
$\alpha_x\beta_2$ (p150,95)	CD11c/CD18	IDC, LIE, NK, Mo, Mac	C3bi, CO, FG, ICAM-1,-2, -4 VCAM-1
$\alpha_D\beta_2$	CD11d/CD18	Mac	ICAM-3, VECAM-1
$\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa)	CD41/CD61	Megacariocitos, plaquetas	FG, FN, THR, VN, VWF
$\alpha_V\beta_3$	CD51/CD61	Amplia	BSP, DEL-1, FG, FIBRILLIN, FN, LAP-TGFβ, MFG-E8, OP, PECAM-1, THR, TN, VN, VWF
$\alpha_6\beta_4$	CD49f/CD104	Epitelio, endotelio, células de Schwann, células T	LM
$\alpha_V\beta_5$	CD51/-	Amplia	BSP, DEL-1, MFG-E8, OP, VN
$\alpha_V\beta_6$	CD51/-	Epitelio	FN, LAP-TGFβ, OP
$\alpha_4\beta_7$ (LPAM-1)	CD49d/-	Células T, células B	FN. MAdCAM-1, OP, VCAM-1
$\alpha_E\beta_7$	-/-	LIE	E-cadherina
$\alpha_v\beta_8$	CD51/-	Neuronas	LAP-TGFβ

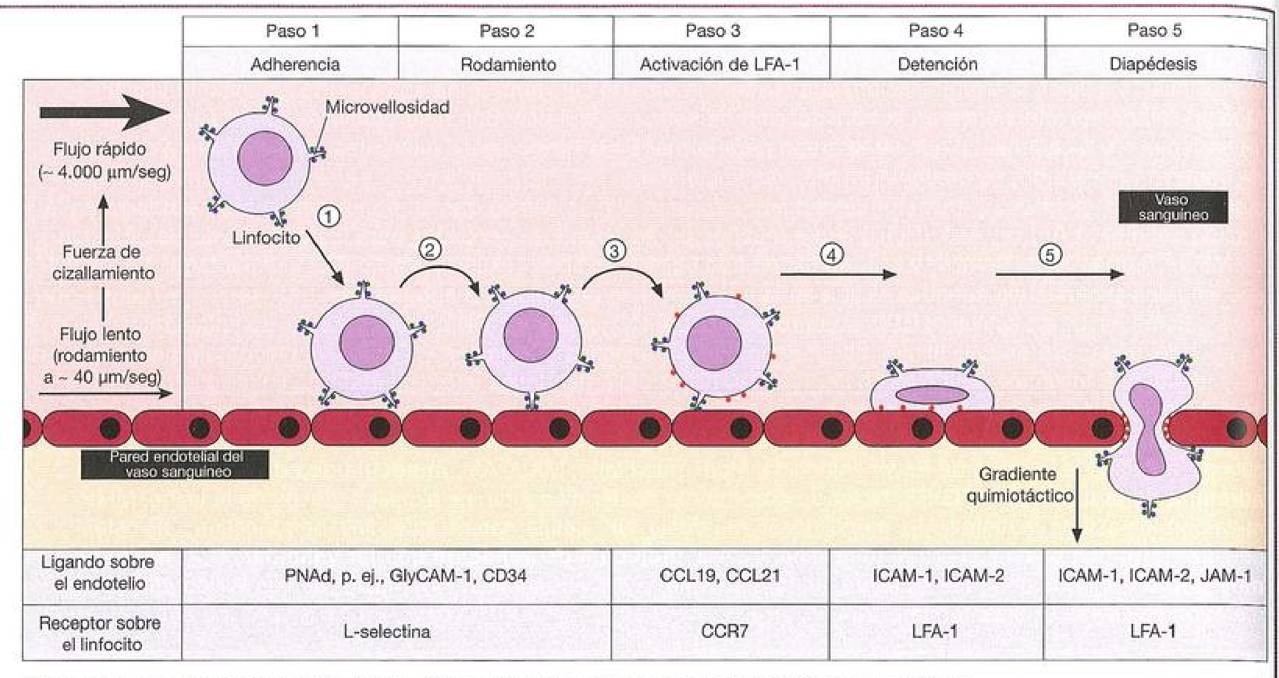


Figura 7.6. Asentamiento y transmigración de linfocitos en los ganglios linfáticos periféricos.

Los linfocitos de movimiento rápido se fijan *(paso 1)* a las paredes de los vasos del tejido a los que fueron guiados para ingresar mediante una interacción entre receptores de asentamiento específicos, como L-selectina (•) localizada sobre las microvellosidades del linfocito y sus ligandos adresina de ganglio periférico (PNAd), sobre la HEV de la pared del vaso. PNAd comprende varias moléculas, entre ellas CD34 y GlyCAM-1, las cuales poseen las estructuras fucosiladas, sulfatadas y sialiladas de Lewis. Sobre estas células T y B también están presentes varios receptores para quimiocina (•). Después de rodar a lo largo de la superficie de las células endoteliales *(paso 2)*, se produce la activación de la integrina LFA-1 del linfocito (•) (véase el Cuadro 7.1) *(paso 3)* en respuesta a la estimulación por las quimiocinas. En las células T este paso está regulado sobre todo por CCL19 y CCL21 que se unen a CCR7, como se muestra, mientras que en las células B CXCL13 que se unen a CXCR5 proporciona señales adicionales. Obsérvese que, como LFA-1 está ausente en las microvellosidades, la unión firme tiene lugar por el cuerpo del linfocito a sus ligandos, ICAM-1/2, en el endotelio. Este proceso da como resultado la detención de la célula y el aplanamiento *(paso 4)*, seguidos de la migración del linfocito entre las células endoteliales adyacentes, proceso denominado diapédesis que implica la unión de LFA-1 no sólo a ICAM-1/2, sino también a la molécula de adhesión de unión-1 (JAM-1), que se halla presente entre las células endoteliales (*paso 5*).

el endotelio actúan como **adresinas vasculares.** Así, la selectina L reconoce las sialomucinas glucosiladas y sulfatadas GlyCAM-1 y CD34 presentes en las HEV de los ganglios linfáticos periféricos (Figura 7.6). Las quimiocinas (una familia de moléculas con funciones quimiotácticas y de otro tipo) presentadas por el endotelio vascular desempeñan un papel fundamental en la activación de la detención de los linfocitos; los receptores de las quimiocinas en el linfocito intervienen tanto en la unión a su ligando como en la activación funcional de integrinas. Así, los linfocitos vírgenes, y también las células dendríticas, expresan el receptor de quimiocina CCR7 y, por consiguiente, se dirigen a los ganglios linfáticos periféricos por el hecho de que las HEV en los ganglios tienen CCL19 y CCL21 (véase el Cuadro 9.2) sobre su superficie luminal. Mientras que CCL21 es producido por las células endoteliales, CCL19 es secretado por la red de células reticulares fibroblásticas dentro del ganglio linfático, después transferido a la HEV. No sorprende que en el ratón *plt/plt*, que carece de la expresión de ambas quimiocinas, la migración de las células T hacia los ganglios linfáticos periféricos sea defectuosa. La activación por quimiocina de las integrinas es el resultado de las señales de quimiocina que facilitan su movilidad lateral en la membrana celular y también por la inducción de cambios estructurales en las integrinas que llevan a un estado de mayor afinidad.

La transmigración se produce en tres etapas

Pasos 1 y 2: Adherencia y rodamiento

Para que el linfocito se adhiera a la HEV, debe superar las fuerzas de cizallamiento creadas por el flujo sanguíneo. Esto se logra mediante una fuerza de atracción entre los receptores de asentamiento y sus ligandos en la pared del vaso, que opera a través de las microvellosidades en la superficie del leucocito (Figura 7.6). Tras este proceso de adherencia, el linfocito rueda sobre la célula endotelial, y la selectina L y otras moléculas de adhesión sobre el linfocito se unen a sus ligandos en el endotelio. Por lo general, las selectinas terminan en un dominio lectina (de ahí, "selectina"), como podría esperarse dada la naturaleza oligosacárida de los ligandos.

Pasos 3 y 4: La activación de LFA-1 produce una adhesión firme

Este proceso conduce a la activación y el reclutamiento de LFA-1 en la superficie no vellosa del linfocito. Esta integri-

na se une de manera muy firme al ICAM-1 y al ICAM-2 sobre la célula endotelial, y el contacto íntimo que causa el rodamiento del linfocito determina la detención y el aplanamiento del linfocito.

Paso 5: Diapédesis

El linfocito aplanado utiliza ahora al LFA-1 para unirse a los ICAM y a la molécula de adhesión de unión-1 (JAM-1) en las células endoteliales de modo de abrirse camino entre las células endoteliales y en el tejido en respuesta a las señales quimiotácticas.

Asentamiento de los linfocitos en otros tejidos

El asentamiento de los linfocitos activados y de memoria en otros tejidos implica un proceso similar, pero con la participación de otros receptores y ligandos (Figura 7.7). Las células dendríticas del tejido adecuado parecen desempeñar una función importante en imprimir selectivamente el código de la dirección correcta durante la activación de las células T vírgenes. Las células que intervienen en la inmunidad de las mucosas tienen la marca de ingresar a las placas de Peyer mediante la unión a las HEV es esta localización. En otros casos que implican la migración en tejidos normales e inflamados, los linfocitos se unen a los endotelios aplanados no especializados y los atraviesan.

Es fundamental que, una vez activados en los tejidos linfoides secundarios, los linfocitos con especificidad antigénica correspondiente rápidamente puedan desplegarse en el sitio de la infección. La sobreexpresión aislada de las integrinas VLA-4 y LFA-1 en estas células activadas específicas del antígeno les permite detectar moléculas de adhesión celular VCAM-1 e ICAM-1, respectivamente, que se expresaron sobre el endotelio vascular en respuesta a la producción de IL-1en los tejidos inflamados.

Ganglios linfáticos

El tejido encapsulado de los ganglios linfáticos actúa como un filtro para la linfa que drena los tejidos del cuerpo (Figura 7.8a). La linfa, que tal vez contenga antígenos extraños presentes en los tejidos, ingresa en el seno subcapsular por los vasos linfáticos aferentes. El seno subcapsular rodea la totalidad del ganglio linfático y, junto con los senos trabeculares, permite que los antígenos más grandes sean endocitados por los macrófagos residentes que revisten los senos subcapsulares y medulares o que pasen sin obstáculos a los linfáticos eferentes (Figuras 7.4 y 7.8b). Los macrófagos residentes, junto con las células dendríticas que han captado el antígeno en los tejidos y arriban por los linfáticos aferentes, pueden actuar como células presentadoras de antígeno para las células T en el ganglio linfático.

Las células B vírgenes, independiente de su especificidad por el antígeno, pueden usar sus receptores para el complemento para transportar los inmunocomplejos desde el seno subcapsular a las **células dendríticas foliculares** (FDC) para la presentación a las células B específicas para el antígeno. Aún hay controversias acerca de la ontogenia de las FDC, pero son células no hematopoyéticas, claramente distintas de las células dendríticas interdigitadas, y tal vez derivadas

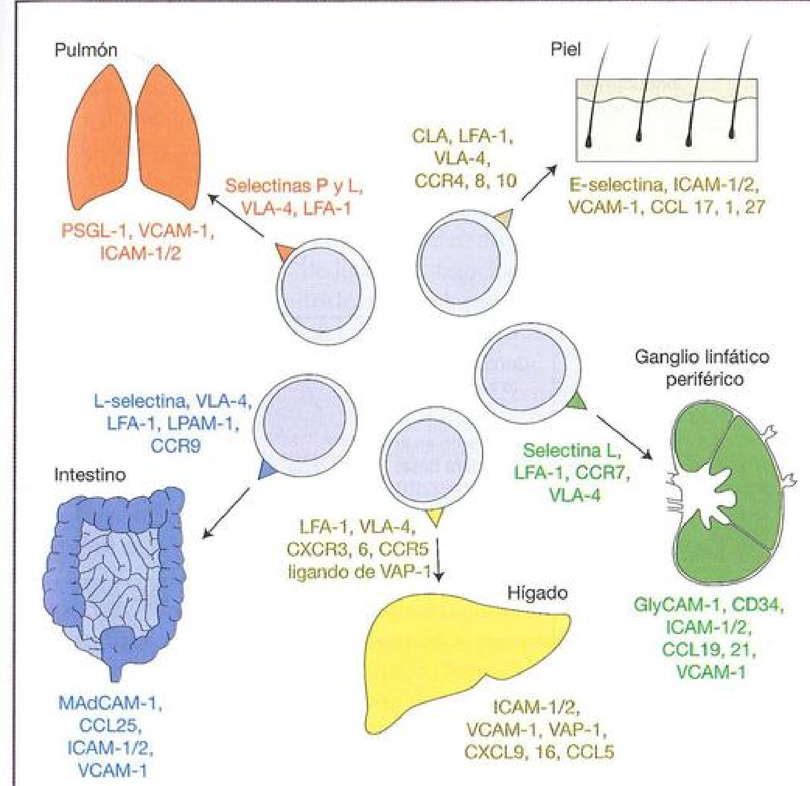
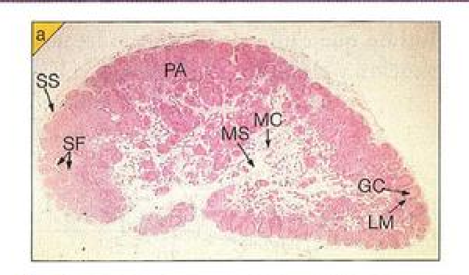


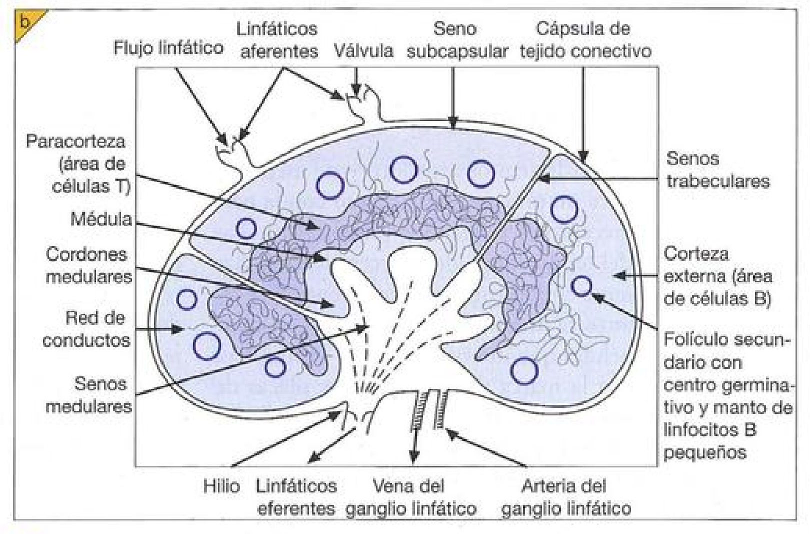
Figura 7.7. El acceso a los tejidos requiere el código de dirección correcta.

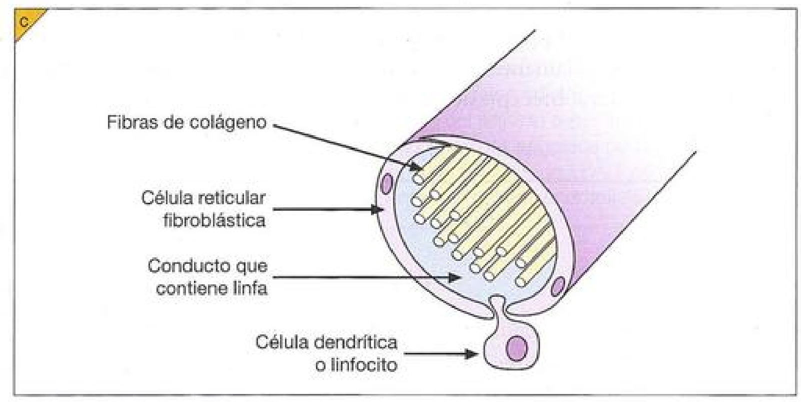
Las células T (y las células dendríticas) están destinadas a transportar a diversas localizaciones un código de combinación de las moléculas de la superficie celular que reconocen sus ligandos respectivos en el endotelio vascular. Algunos pares de ligando-ligando son los mismos, sea cual fuera el tejido de destino, como LFA-1 que se une a ICAM-1 e ICAM-2, y la integrina $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) que se une a VCAM-1. Otras interacciones utilizan moléculas de adhesión que se unen a ligandos expresados en localizaciones específicas. Están bien identificados los del intestino y los de la piel, mientras que siguen siendo tema de especulación los que median el asentamiento en pulmón e hígado. Así, la selectina L reconoce GlyCAM-1 y CD34 en el endotelio del ganglio linfático periférico, pero reconoce MAdCAM-1 (molécula de adhesión celular adresina vascular de la mucosa -1) en el endotelio del intestino. Ambas selectinas L y P se unen a PSGL-1 (ligando 1 de la glucoproteína selectina P) en el endotelio pulmonar. El reconocimiento de selectina E por el CLA (antígeno del linfocito cutáneo) dirige a los linfocitos unidos a la piel a la localización correcta. Además, los receptores para quimiocina (véase el Cuadro 9.2) reconocen tejidos que exhiben quimiocinas particulares.

Figura 7.8. Ganglio linfático.

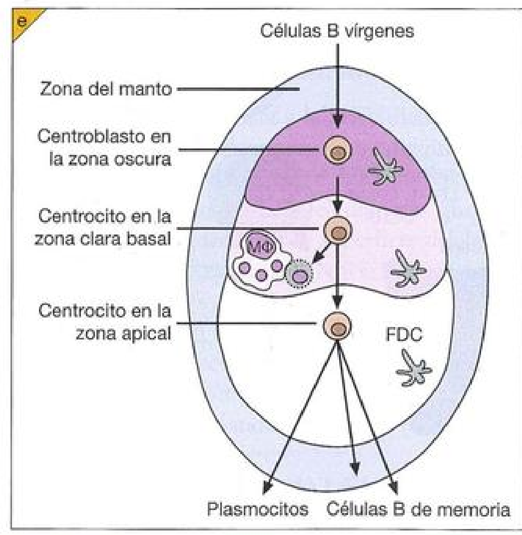
a) Ganglio linfático humano, imagen de microscopia óptica con bajo aumento. GC, centro germinativo; LM, manto de linfocitos del folículo secundario; MC, cordones medulares; MS, seno medular; PA, área paracortical; SF, folículo secundario; SS, seno subcapsular.
b) Esquema del corte de un ganglio linfático entero. Cada ganglio linfático recibe el aporte de varios vasos linfáticos aferentes, pero en general tiene sólo un vaso linfático eferente. c) Las redes de conductos que presentan el parénquima del ganglio linfático están compuestas de haces de colágeno rodeados por células reticulares fibroblásticas. Las redes están repletas de linfa y transportan antígenos pequeños y quimiocinas a áreas diferentes del ganglio linfático.
d) Folículo linfoide secundario que muestra el centro germinativo rodeado por un manto de linfocitos B pequeños teñidos mediante anti-IgD humana marcada con peroxidasa de rábano picante *(color pardo)*. Hay escasas células IgD-positivas en el centro, pero ambas áreas contienen linfocitos B IgM-positivos.
e) Diferenciación de las células B durante el pasaje a través de las diferentes regiones de un centro germinativo activo. Los macrófagos engloban las células B apoptósicas en la zona laxa central Los precursores de plasmocitos abandonan el centro germinativo antes de alcanzar la madurez completa, mientras que las células B de memoria pueden abandonar el centro germinativo o ingresar a la zona del manto. FDC, célula dendrítica folicular; MΦ, macrófago. [(a) Fotografía cedida por P. M. Lydyard y (d), por A. MacLennan.]











de las células madre mesenquimáticas. No son fagocíticas y carecen de lisosomas, pero tienen prolongaciones alargadas que establecen contacto estrecho con los linfocitos B.

Dentro del parénquima del ganglio linfático, hay redes muy amplias de conductos compuestos por fibras de colágeno con una vaina que las recubre compuesta por células **reticulares fibroblásticas** (*fibroblastic reticular cells,* FRC) para formar canales de 200 nm a 3 µm de diámetro (Figura 7.8c). La linfa que contiene antígenos pequeños (menores de alrededor de 70kDa), las quimiocinas y otras sustancias de bajo peso molecular atraviesan los canales del sistema de conductos para penetrar al ganglio linfático. Como las FRC no forman un sellado completo alrededor de los canales, tanto las células dendríticas como los linfocitos pueden extender las prolongaciones al interior de los conductos, por lo que logran el acceso a la linfa que contiene el antígeno y pueden recibir las señales de la quimiocina.

Lo que es tan sorprendente de la organización de los ganglios linfáticos es que los linfocitos T y B están separados en diferentes compartimentos anatómicos, un proceso dirigido en gran medida por estas quimiocinas. Las células del estroma del ganglio linfático (y en menor medida las IDC) secretan CCL19 y CCL21 en la paracorteza que se deposita localmente en la superficie de las HEV y FRC, lo que atrae así a las células T que portan CCR7. Por el contrario, CXCL13 producida por las células del estroma en la corteza atrae a las células B CXCR5 positivas.

Áreas de células B

Las agregaciones foliculares de los linfocitos B son una característica destacada de la corteza externa. En el ganglio no estimulado se presentan como agrupaciones esféricas de células, denominadas **folículos primarios**, pero después de la exposición al antígeno forman **folículos secundarios**, constituidos por una corona o manto de pequeños linfocitos B en reposo y dispuestos concéntricamente, que poseen tanto IgM como IgD sobre su superficie, que rodea un **centro germinativo** de tinción pálida (Figura 7.8d,e). Éste contiene grandes blastos B, por lo general en proliferación, una minoría de células T, macrófagos reticulares convencionales dispersos, que presentan "cuerpos teñibles" de linfocitos fagocitados, y una red apretada de **células dendríticas foliculares** (FDC). Las FDC producen el factor activador de las células B o BAFF, un miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) que estimula la supervivencia de las células B en el centro germinativo por inhibición de la apoptosis de las células B en proliferación. Los centros germinativos se encuentran muy agrandados en las respuestas secundarias de anticuerpos, durante las cuales constituyen sitios de maduración de las células B y de generación de células B de memoria.

En ausencia de un estímulo antigénico, los folículos primarios están compuestos por una malla de células dendríticas foliculares cuyos espacios son ocupados por pequeños linfocitos B recirculantes, pero en reposo. Frente al estímulo con una dosis única de un antígeno timodependiente (es decir, el antígeno para el cual las células B necesitan la cooperación de las células T *helper*, véase p. 217), los folículos primarios evolucionan en secundarios, que contienen centros germinativos en los que la red de células dendríticas foliculares pueda ser colonizada hasta por células B específicas que crecen en forma exponencial. Estas células que proliferan forman lo que se denomina zona oscura debido a la agrupación densa de linfocitos con la producción de alrededor de 10^4 de los denominados centroblastos. El reclutamiento de células B en la zona oscura del centro germinativo depende de la producción local de la quimiocina CXCL12 detectada por CXCR4 sobre las células B. Los centroblastos desplazan las células B en reposo originales, que ahora forman el manto folicular. Esos centroblastos altamente mitóticos, sin IgD de superficie (sIgD) y con muy poca sIgM, se diferencian entonces en centrocitos dentro de un área menos densa de centros germinativos denominada zona clara basal. Los centrocitos no cumplen ciclos y comienzan a regular positivamente su expresión de sIg. En este estadio, hay una muerte celular apoptósica muy extensa de células B con especificidad o afinidad inadecuada que da origen a fragmentos de DNA visibles como "cuerpos teñibles" dentro de los macrófagos, el sistema de desecho de las células muertas. Los sobrevivientes sufren su diferenciación final en la zona clara apical. Una parte de los que son desviados por la vía de las células de **memoria** se instalan con la población de la zona del manto, y el resto se une a la dotación de células B circulantes. Otras células B del centro germinativo en la zona clara apical se diferencian en plasmablastos, con un retículo endoplasmático bien definido, un aparato de Golgi prominente e inmunoglobulina citoplasmática; estas células migran para convertirse en plasmocitos en los cordones medulares que se proyectan entre los senos medulares (Figura 7.8b). La maduración de las células formadoras de anticuerpos en un sitio alejado de aquel en el que se produjo la estimulación antigénica también se observa en el bazo, en cuya zona marginal predominan los plasmocitos. Se considera que este movimiento de células se cumple para impedir la generación de concentraciones locales elevadas de anticuerpos dentro del centro germinativo, lo cual evita la neutralización del antígeno y la interrupción prematura de la respuesta inmunitaria.

El resto de la corteza externa también es, en esencia, un área de células B con células T dispersas.

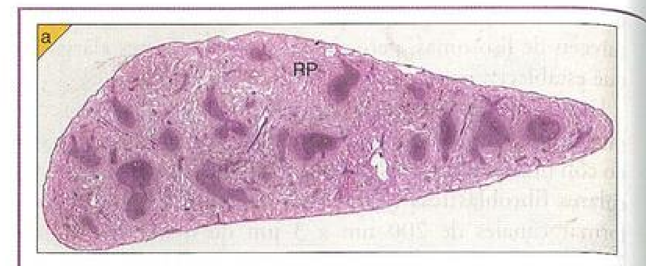
Áreas de células T

Las células T están confinadas sobre todo a la denominada región paracortical (o timodependiente) (Figura 7.8a,b). En los ganglios obtenidos de niños con deficiencia selectiva de células T o de ratones con timectomía neonatal, se observa que la región paracortical prácticamente se encuentra desprovista de linfocitos. Las técnicas como la microscopia intravital de exploración láser con excitación molecular de dos fotones permiten la observación del comportamiento del linfocito dentro del tejido linfoide. Se observa que las células T se mueven con rapidez y al azar dentro de la región paracortical en su intento de encontrar una IDC que tenga "su" antígeno. El TCR sobre la célula T debería reconocer el CMH-péptido relacionado, una unión estable que en gran parte está consolidada por LFA-1 sobre la célula T que se une a ICAM-1 en la IDC. Se genera una sinapsis inmunitaria y el contacto se mantiene durante 8-24 horas para activar totalmente a las células T.



Bazo

El bazo se divide en la pulpa blanca, que actúa como tejido linfoide secundario, y la pulpa roja, con gran contenido de macrófagos y la responsable de la eliminación por fagocitosis de los eritrocitos envejecidos, las plaquetas y algunos patógenos transmitidos por la sangre. El tejido linfoide que forma la pulpa blanca se observa como áreas circulares o alargadas (Figura 7.9a) dentro de la pulpa roja repleta de eritrocitos que se hallan formadas por cordones esplénicos revestidos por macrófagos y sinusoides venosos. Al igual que en el ganglio linfático, las áreas de células T y B están separadas (Figura 7.9b). Además de actuar como un filtro de sangre muy eficaz para la eliminación de células deterioradas, el bazo también es importante en generar respuestas inmunitarias contra los antígenos transportados por la sangre, más cuando son corpusculares. Los plasmablastos y los plasmocitos maduros se presentan en la zona marginal que se extiende hacia la pulpa roja (Figura 7.9c).



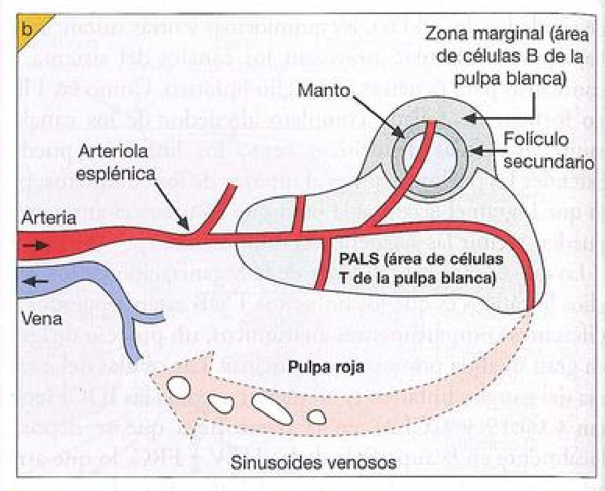




Figura 7.9. Bazo.

a) Vista con bajo aumento de la pulpa roja (RP) y la pulpa blanca (WP) linfoides. Tinción triple de Mallory. Gentilmente provista por G. Campbell. b) Representación esquemática de un sector de la pulpa blanca rodeada por la pulpa roja. c) Imagen con gran aumento del centro germinativo (GC) y del manto linfocítico (M) rodeados por la zona marginal (MZ) y la pulpa roja (RP). Adyacente al folículo, una arteriola (A) está rodeada por la vaina linfoide periarteriolar (PALS) constituida sobre todo por células T. Obsérvese que la zona marginal sólo está presente por encima del folículo secundario. (Fotografía de I.C.M. MacLennan.)

Sistema inmunitario de la piel

Los patógenos se encontrarán primero con las superficies corporales: la piel o las mucosas (véase más adelante). Éstas se encuentran dotadas de diversas barreras externas contra la infección (véase la Figura 1.6), y sólo si se producen soluciones de continuidad, las células del sistema inmunitario entran en acción. En estado normal, no inflamado, la epidermis está provista de células de Langerhans y de células T residentes, mientras que la dermis subyacente contiene células dendríticas, células T, macrófagos y mastocitos. Hay una migración continua de leucocitos desde los vasos sanguíneos hacia la piel; estas células buscan signos de infección y luego regresan a la circulación por medio de los conductos y los ganglios linfáticos. Si un patógeno provoca una reacción inflamatoria, aparecen con bastante rapidez en la piel otras células del sistema inmunitario, como neutrófilos, monocitos, eosinófilos y plasmocitos. En ciertas enfermedades, como el eccema atópico, el número de leucocitos en la piel aumenta de manera sustancial. La inflamación cutánea está dirigida por varias moléculas de adhesión, entre las cuales las integrinas LFA-1 y VLA-4 y el antígeno leucocítico cutáneo (CLA) tienen funciones importantes (Figura 7.7). El receptor de quimiocina CCR4 se expresa en la mayoría de las células T CLA$^+$, y su ligando CCL17 es presentado en las paredes de los vasos sanguíneos de la piel. Otra quimiocina, CCL27, es expresada por los queratinocitos, y su receptor, CCR10, en una subpoblación de células TCLA$^+$. Algunas de las células TCLA$^+$ presentes en la piel son reguladoras CD4$^+$ Foxp3$^+$.

Inmunidad de las mucosas

Muchos patógenos infectan las superficies de las mucosas, por ejemplo, tras la ingestión, la inhalación o la transmisión por vía sexual. El tubo digestivo y las vías respiratorias y genitourinarias están defendidos, desde el punto de vista inmunitario, por acumulaciones subepiteliales de células y tejidos linfoides que no se hallan circunscriptos por una cápsula de tejido conectivo (Figura 7.10). Pueden aparecer como colecciones difusas de linfocitos, plasmocitos y fagocitos a lo largo del pulmón y la lámina propia de la pared intestinal (Figura 7.10c), o como tejido organizado (tejido linfoide asociado a las mucosas, MALT) con folículos bien diferenciados. En los seres humanos, el MALT comprende

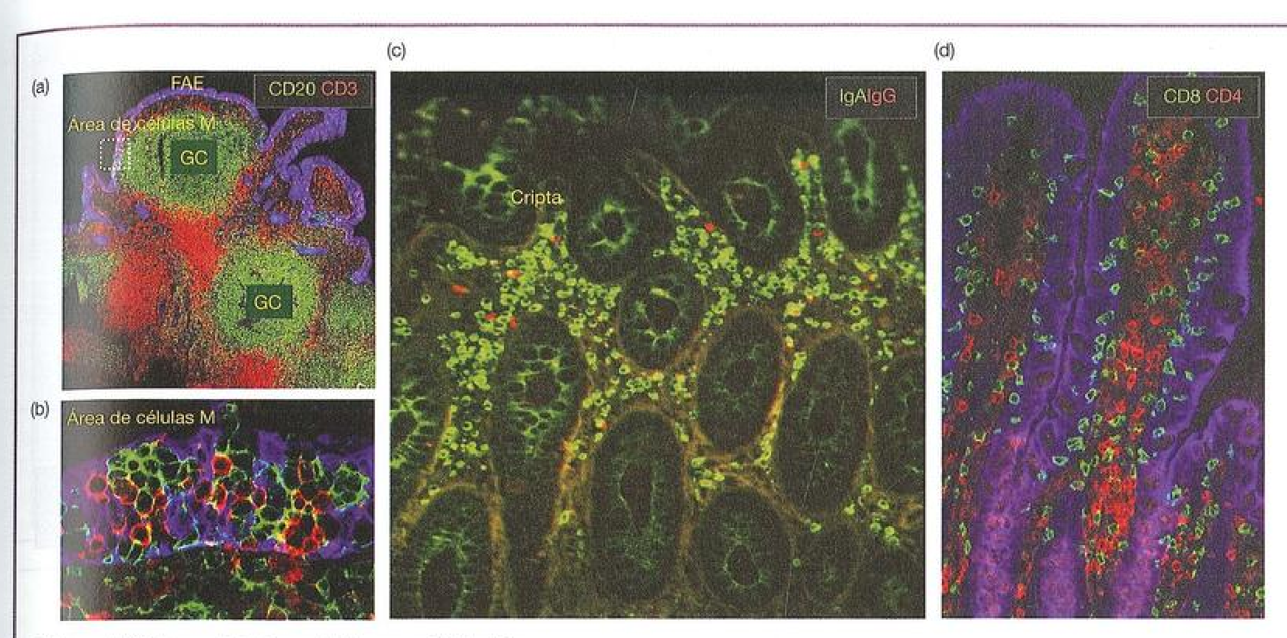


Figura 7.10. Inmunidad asociada con el intestino.

a) Tinción de inmunofluorescencia que indica las células B (con anti-CD20, *verde*), las células T (con anti-CD3, *rojo*) y el epitelio asociado al folículo (FAE) (con anti-citoqueratina, *azul*) en las placas de Peyer del intestino delgado humano. GC, centro germinativo; célula M, células con micropliegues. b) Detalles del área de las células con micropliegues (células M) que examinan el antígeno. c) Tinción para IgA (*verde*) e IgG (*rojo*) en un corte de mucosa del intestino grueso humano. El epitelio de la cripta revela el transporte selectivo de IgA. Sólo se observan algunas células productoras de IgG esparcidas en la lámina propia, junto con numerosos plasmocitos con IgA (tinción verde brillante). d) Tinción para células T CD4 (*rojo*) y CD8 (*verde*) en la mucosa duodenal humana. El epitelio de las vellosidades aparece de color azul (citoqueratina). La expresión de CD4 débil observada como fondo corresponde a macrófagos o células dendríticas. (Reproducido con autorización de Brandtzaeg P. Pabst R. [2004], *Trends in Immunology* 25, 570-577, con autorización de los editores.)

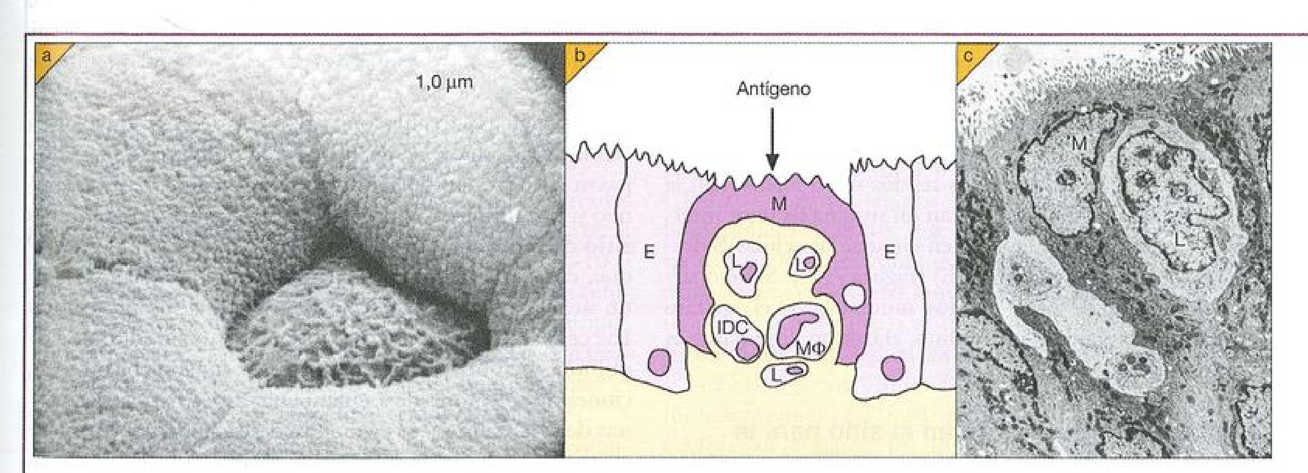


Figura 7.11. Célula M dentro del epitelio de la placa de Peyer.

a) Microfotografía electrónica de barrido de la superficie del epitelio de la placa de Peyer. La célula M que examina el antígeno en el centro está rodeada por enterocitos absorbentes recubiertos de microvellosidades regulares estrechamente compactadas. Se observan los micropliegues irregulares y cortos de la célula M. (Reproducido con autorización de los autores y editores de Kato T. y Owen R.L. [1999] En Ogra R. y col. [eds.] *Mucosal Immunology*, 2ª ed. Academic Press, San Diego.) b) Tras la captación y el transporte transcelular por la célula M (M), el antígeno es procesado por los macrófagos y las células dendríticas, que presentan el antígeno a las células T en las placas de Peyer y los ganglios linfáticos mesentéricos. E, enterocito; IDC, célula dendrítica interdigitada; L, linfocito; MΦ, macrófago. c) Microfotografía electrónica de una célula M (M en el núcleo) con el linfocito adyacente (L en el núcleo). Las células epiteliales que están a los lados son enterocitos absorbentes con una borde en cepillo típico. (Citrato de plomo y acetato de uranilo, × 1.600). [(b) Basado en Sminia T. & Kraal G. [1998] En Delves P.J. y Roitt I.M. [eds.] *Encyclopedia of Immunology*, 2ª ed, p. 188. Academic Press, Londres.]

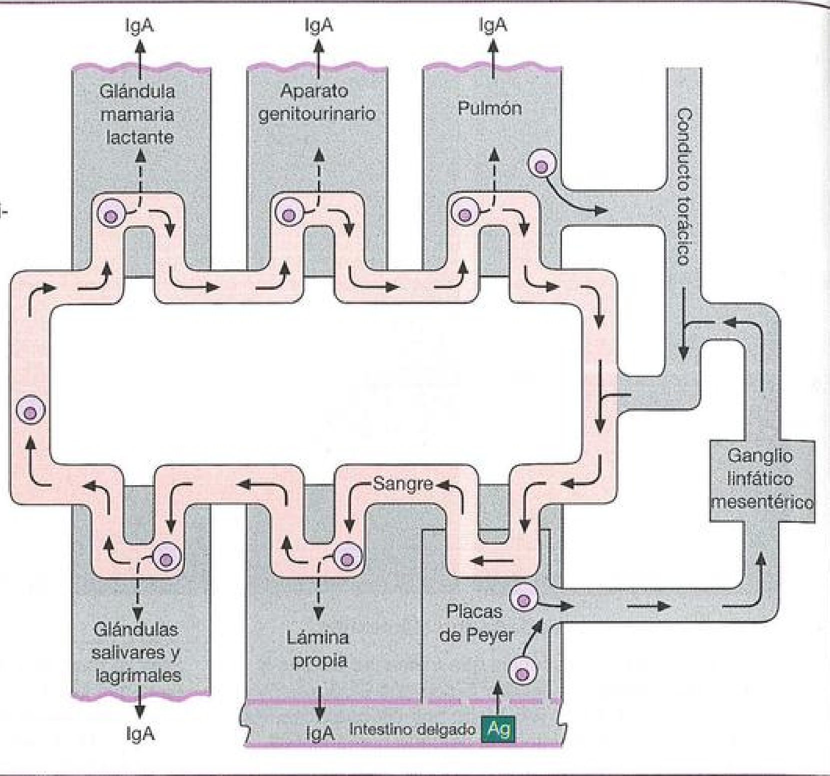


Figura 7.12. Circulación de linfocitos dentro del sistema linfoide asociado a mucosas.
Las células estimuladas por antígeno se movilizan desde las placas de Peyer para colonizar la lámina propia y otras superficies mucosas ( ), y forman lo que se ha descrito como un sistema inmunitario común de las mucosas.

las amígdalas lingual, palatina y faríngea, las placas de Peyer del intestino delgado (Figura 7.10a) y el apéndice. El tejido linfoide del intestino está separado de la luz por epitelio cilíndrico con uniones estrechas y una capa mucosa. Este epitelio aparece intercalado con células de los micropliegues (células M; Figuras 7.10b y 7.11), células especializadas para el transporte del antígeno con microvellosidades cortas e irregulares en su superficie apical que endocitan antígenos. Las vesículas endocíticas transportan el antígeno que va a ser exocitado en la superficie basal para su presentación a los linfocitos intraepiteliales, las células dendríticas y los macrófagos (Figura 7.11b,c).

En conjunto, las células y los tejidos relacionados con la inmunidad de las mucosas forman un sistema secretor interconectado dentro del cual pueden circular las células B destinadas a la síntesis de IgA (e IgE) (Figura 7.12). Sin embargo, a diferencia de otros tejidos mucosos, en el aparato reproductor, femenino y masculino, el isotipo dominante es la IgG derivada del plasma.

Las placas de Peyer forman el sitio para la inducción de las respuestas inmunitarias en el intestino

El material extraño, como las bacterias, es captado por las células M y pasa a las células presentadoras de antígeno de la placa de Peyer subyacente, que entonces activan a los linfocitos correspondientes. Así, las **placas de Peyer** constituyen el **sitio de inducción** de las respuestas inmunitarias en el intestino. Tras su activación inducida, los linfocitos se dirigen por la linfa hacia los ganglios linfáticos mesentéricos, donde pueden producirse la activación adicional y la proliferación. Una característica especial de las células presentadoras de antígeno de las placas de Peyer, los ganglios linfáticos mesentéricos y la lámina propia es que contienen una población de células dendríticas CD103⁺ que expresan enzimas retinoico deshidrogenasas que convierten la vitamina A en ácido retinoico. ¿Por qué esto es importante? Porque resulta que la estimulación a través de los receptores del ácido retinoico (RAR; *retinoic acid receptors*) induce a la célula T a que sobreexpresen tanto los receptores de integrina LPAM-1 ($\alpha_4\beta_7$) y los receptores de asentamiento del intestino CCR9, así como el incremento de la diferenciación de células T reguladoras Foxp3⁺ y de la producción de células B productoras de IgA. Estos linfocitos "marcados" pasan entonces por el conducto torácico al torrente sanguíneo y, por último, a la **lámina propia** (Figura 7.12). En este **sitio de repuesta,** ayudan a las células B formadoras de IgA que, como ahora están ampliamente distribuidas, protegen un área amplia del intestino con anticuerpos protectores. Las células T y B también aparecen en el tejido linfoide del pulmón y en otros sitios de la mucosa guiados por interacciones de receptores de asentamiento específicos con adresinas de HEV apropiadas, como se describió antes. Es interesante que la inmunización intranasal sea particularmente eficaz para la formación de anticuerpos en las vías genitourinarias.

Linfocitos intestinales

El ligando de la integrina LPAM-1, MAdCAM-1, está presente en las vénulas poscapilares de la lámina propia del intestino (Figura 7.13) y por esto facilita el arribo de las células T intestinales. Estas células T tienen un fenotipo más o menos comparable con el de los linfocitos de la sangre periférica: >95% del receptor de células T (TCR) $\alpha\beta$ y una relación

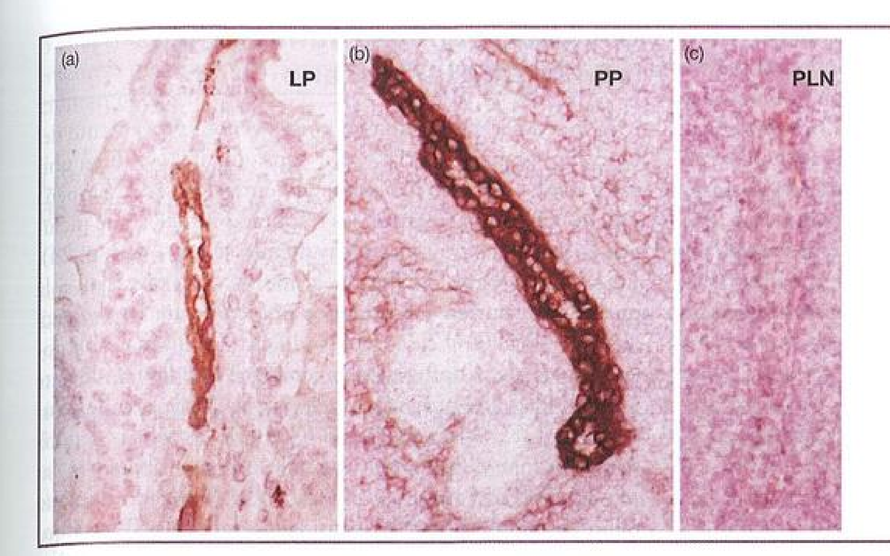


Figura 7.13. Expresión selectiva de la adresina vascular de la mucosa MAdCAM-1 sobre el endotelio que interviene en la localización de los linfocitos en sitios gastrointestinales.

La tinción inmunohistológica pone de manifiesto la presencia de MAdCAM-1: a) sobre las vénulas poscapilares de la lámina propia del intestino delgado; y b) sobre el HEV en las placas de Peyer, pero su ausencia de c) del HEV en los ganglios linfáticos periféricos. (Reproducido con autorización de Butcher E.C. y cols. [1999], *Advances in Immunology* **72**, 209.)

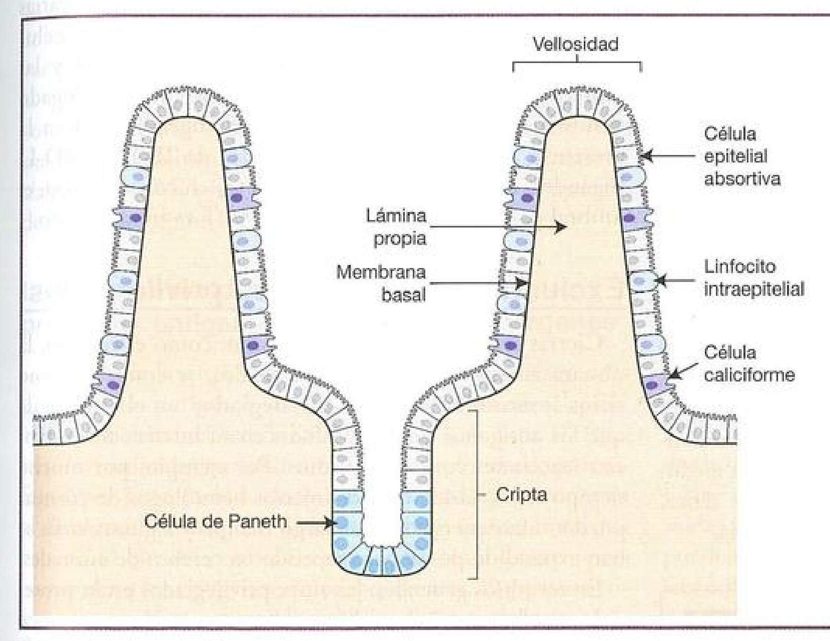


Figura 7.14. Linfocitos intraepiteliales (LIE).

Los LIE están intercalados entre las células epiteliales de las vellosidades del intestino. Las células absortivas con microvellosidades prominentes digieren y absorben nutrientes, las células caliciformes secretan moco y las células de Paneth en las criptas secretan lisozima y defensinas.

CD4:CD8 de 7:3, y parecen ser sobre todo células activadas o de memoria. Las respuestas inmunitarias injustificadas en el intestino pueden ser inhibidas tras la secreción de IL-10 y el factor transformador del crecimiento β (TGFβ por las células T reguladoras inducibles. Dentro de la lámina propia, también hay una proliferación abundante de células B activadas y plasmocitos que secretan IgA para el transporte por el receptor de poli-Ig a la luz intestinal (véase p. 68).

Los **linfocitos intraepiteliales** (LIE) intestinales son bastante diferentes. Tanto ellos como las células dendríticas intraepiteliales expresan concentraciones elevadas de integrina $\alpha_E\beta_7$ que se une a la cadherina E de las células epiteliales intestinales que, de ese modo, localizan los LIE entre las células epiteliales (Figura 7.14) En su mayoría son células T, y en los seres humanos cerca del 10% tiene TCR γδ en otras especies, las células T γδ pueden representar hasta el 40% de los LIE. De los que poseen TCR αβ, casi todos son $CD8^+$ positivos, y en los ratones pueden dividirse en dos poblaciones. Un tercio contiene la forma convencional de CD8, un heterodímero compuesto por una cadena CD8 αα y una cadena CD8 αα. Las dos terceras partes expresan, en cambio, un homodímero CD8 αα, que casi con exclusividad se encuentra sólo en los LIE. Aunque las células T CD8 αα TCR γδ existen tanto en los seres humanos como en los ratones, es un tema de controversias la existencia de linfocitos intraepiteliales CD8 αα TCR αβ en los seres humanos.

Los LIE que son células T convencionales con TCR αβ y un heterodímero CD8 αβ reconocen el complejo péptido-CMH. Sin embargo, los linfocitos intraepiteliales TCR αβ que expresan CD8 αα se generan de manera eficaz en los ratones con desactivación génica para la clase I y para CD1 y, por consiguiente, no reconocen el antígeno presentado por cualquiera de estas moléculas. Aún es poco claro si estos ratones están restringidos o no para las moléculas no clásicas del CMH (véase p. 108) como TL y Qa1, si bien se postuló que ellas actúan como una línea defensiva relativamente primitiva en las superficies externas del cuerpo. Los miembros de la familia relacionada con la cadena de clase I del CMH (MIC), MICA y MICB (véase p. 108) parecerían estar implicados en la activación de los LIE TCR γδ.

Reflexiónese por un momento en el hecho de que alrededor de 10^{14} de bacterias residen en la luz intestinal del ser humano adulto normal. Durante una infección, muchas de éstas se comportarán como microorganismos patógenos en lugar de como comensales inofensivos. Si se combina con la barrera de mucinas producidas por las células caliciformes y la zona protectora de anticuerpos secretados del tipo IgA, estas colecciones de linfocitos intestinales representan una línea de defensa crucial. En efecto, el número de linfocitos intraepiteliales en el intestino delgado del ratón representa casi el 50% del total de células T en todos los órganos linfoides.

La médula ósea es un sitio importante de síntesis de anticuerpos

Si bien las células B maduran en la médula ósea a partir de las células madre hematopoyéticas, tras la maduración la mayoría de las células B vírgenes se dirigen a los órganos linfoides secundarios y los tejidos donde pueden encontrar al antígeno. Esta liberación desde la médula ósea puede ser regulada por la esfingosina I fosfato, que se sabe controla la salida de linfocitos desde el timo y los ganglios linfáticos. Las células B activadas pueden recircular de nuevo hacia la médula ósea y agruparse alrededor de los sinusoides vasculares. En esta localización, pueden intervenir en las respuestas de generación de anticuerpos contra los patógenos transportados por la sangre, y su supervivencia es mantenida por las células dendríticas que segregan la citocina MIF (factor inhibidor de la migración de macrófagos). Está claro que la médula ósea es la residencia principal de los plasmocitos de larga vida (Figura 7.15), cuyos precursores se generan en los centros germinativos de los tejidos linfoides secundarios. Por lo tanto, la médula ósea es la fuente principal de inmunoglobulina sérica. También están presentes las células B y las de memoria.

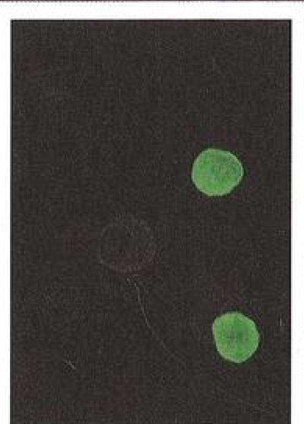




Figura 7.15. Plasmocitos en la médula ósea humana.

Frotis teñido con rodamina *(rojo)* para la cadena pesada de IgA y con fluoresceína *(verde)* para la cadena ligera lambda. Ambas imágenes corresponden al mismo campo: una muestra la fluorescencia verde y la otra, la fluorescencia anaranjada. Por lo tanto, una célula es IgA. λ, otra es IgA.no λ, y la tercera no es IgA λ positiva. (Cortesía de Benner, Hijmans y Haaijman.)

El hígado contiene varias células del sistema inmunitario

El hígado está irrigado con sangre venosa proveniente del intestino y sangre arterial y, por consiguiente, está bien ubicado para controlar los antígenos circulantes. Desempeña una función importante en las respuestas innatas, que incluyen la producción de proteínas de fase aguda (véase p. 24). Junto con el bazo, constituye la localización principal a la que se transportan los inmunocomplejos para su destrucción ulterior. En el caso del hígado, esto se lleva a cabo por las células de Kupffer, los macrófagos residentes de este órgano. Hay una proporción relativamente elevada de células NK y NKT, y se sabe que el CD1d de las células dendríticas es capaz de presentar glucolípidos microbianos a las células NKT del hígado (véase p. 135). El hígado humano también contiene grandes cantidades de células T convencionales que pueden ser activadas a nivel local por varias células presentadoras de antígeno que comprenden las células dendríticas interdigitadas, las células de Kupffer y las células endoteliales sinusoidales. No obstante, el hígado tiende a ser un ambiente bastante tolerógeno debido a la presencia de concentraciones elevadas de IL-10 y PD-L1 (ligandos-1 de muerte programada-1) y, en consecuencia, el umbral para la activación de las células T es bastante alto.

Exclusividad de los sitios privilegiados

Ciertas localizaciones del organismo, como el cerebro, la cámara anterior del ojo y los testículos, se conocen como **sitios inmunológicamente privilegiados**, en el sentido de que los antígenos que se localizan en su interior no provocan reacciones contra sí mismos. Por ejemplo, por mucho tiempo se ha sabido que los injertos heterólogos de córneas pueden mantenerse durante largo tiempo y algunos virus se han expandido por el paso repetido en cerebro de animales.

En términos generales, los sitios privilegiados están protegidos por barreras hematohísticas bastante resistentes y poco permeables a los compuestos hidrófobos y los sistemas de transporte mediados por transportadores. Concentraciones funcionalmente insignificantes de complemento reducen la amenaza de reacciones inflamatorias agudas y de concentraciones extraordinariamente altas de inmunomoduladores, como IL-10 y TGFβ (véase p. 244), que anulan cualquier actividad difícil de controlar de linfocitos Th1. El privilegio inmunitario también se puede mantener por apoptosis de células autoagresivas inducida por Fas (CD95). Lesley Brent lo expresó con claridad: "Puede suponerse que es beneficioso para el organismo no convertir la cámara anterior del ojo o el cerebro en un campo de batalla inflamatorio, porque la respuesta inmunitaria a veces es más nociva que la agresión antigénica que la provocó".

Procesamiento del antígeno

¿Hacia dónde se dirige el antígeno cuando ingresa en el organismo? Si penetra en los tejidos, se transportará por la linfa hasta los ganglios linfáticos que drenan. Los antígenos que se encuentran en las vías respiratorias altas, el intestino

o el aparato reproductor son atrapados por el MALT local, mientras que los antígenos en la sangre provocan una reacción en el bazo.

Los macrófagos son las células presentadoras de antígenos generales

"Clásicamente", siempre se reconoció que los antígenos que drenan en el tejido linfoide son captados por los macrófagos. Los antígenos son luego degradados por completo o en parte en los fagolisosomas; algunos pueden escapar de la célula en una forma soluble para ser captados por otras células presentadoras de antígeno, y una fracción puede reaparecer en la superficie, sea como un fragmento grande o como un péptido procesado, asociado con moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad. Aunque los macrófagos residentes en reposo expresan muy escasa cantidad, si acaso alguna, de moléculas de clase II del CMH, los antígenos suelen hallarse en el contexto de un agente infeccioso microbiano, que puede activar al macrófago para expresar estas moléculas de clase II tras la ocupación de receptores de reconocimiento de patrones como TLR4 por el lipopolisacárido (LPS) bacteriano. Los macrófagos también son inducidos para expresar moléculas de clase II del CMH tras la exposición al IFNγ o la ocupación de CD35 (receptor 1 del complemento).

Las células dendríticas interdigitadas presentan antígenos a los linfocitos T vírgenes

A pesar de la sorprendente capacidad del macrófago para presentar los antígenos, hay una función en la que al parecer es deficiente: la sensibilización de los linfocitos T vírgenes. Los animales que han sufrido una depleción de macrófagos, por la captación selectiva de liposomas que contienen el fármaco fosfonato de diclorometileno, tienen la misma capacidad que sus controles con macrófagos indemnes para responder a los antígenos timodependientes. Debemos arribar a la conclusión de que hay células distintas de los macrófagos que sensibilizan a las células T *helper*, en la actualidad, se acepta que se trata de las células dendríticas interdigitadas (IDC). Estas células, que provienen de la médula ósea, tienen la impresionante capacidad de procesar cuatro veces su propio volumen de líquido extracelular en una hora, lo cual facilita la captura y el procesamiento del antígeno en sus compartimientos intracelulares enriquecidos con moléculas clase II del CMH (MIIC; véase p. 127).

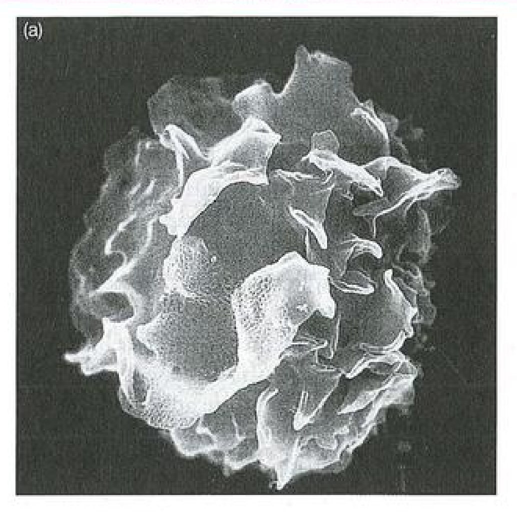
Por consiguiente, las IDC son la "*crème de la crème*" de las células presentadoras de antígeno, y cuando son estimuladas con antígeno antes de inyectarlas en animales, suelen producir respuestas inmunitarias notables. En este sentido, es importante destacar que gran cantidad de esas células dendríticas puede generarse a partir de la sangre periférica por cultivo con factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (véase p. 231) para promover la proliferación, y de IL-4 para suprimir el crecimiento excesivo de los macrófagos. Su empleo en inmunoterapia comenzó a ser explorado, por ejemplo, estimulando células dendríticas autólogas con antígenos tumorales del paciente que después se reinyectan para provocar una respuesta inmunitaria.

Las células dendríticas precursoras en la sangre destinadas a convertirse en células de Langerhans de la piel expresan antígeno leucocítico cutáneo (CLA), que dirige su asentamiento en la piel a través de la interacción con la selectina E en células endoteliales vasculares relevantes, como sucede en las células T cutáneas. Las células de Langerhans y las células dendríticas en otros tejidos actúan como agentes para descubrir el antígeno. Sólo son moderadamente fagocíticas, pero despliegan una gran actividad de endocitosis y pinocitosis. Los receptores implicados en la captura del antígeno, como el receptor de manosa, varios TLR y los receptores FC de IgG e IgE, están presentes sobre las células dendríticas. La expresión de las moléculas de clase II del CMH en la superficie celular y de moléculas de adhesión y coestimuladoras es baja en este estadio temprano del ciclo vital de las células dendríticas. Sin embargo, a medida que se diferencian como células presentadoras de antígeno completamente desarrolladas, su actividad fagocítica y endocitótica disminuye, muestran niveles reducidos de moléculas que intervienen en la captura antigénica, al mismo tiempo que aumentan de manera manifiesta sus moléculas de clase II del CMH. Las moléculas coestimuladoras, como CD40, CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2), también están sobreexpresadas en esta etapa, al igual que la molécula de adhesión ICAM-1, que contribuye tanto a las propiedades migratorias como presentadoras de antígenos de estas células. Su expresión de varios receptores de quimiocinas como CCR5 y CXCR4 (véase el Cuadro 9.2) significa que son atraídas a las áreas de células T en el tejido linfoide y, de manera imprevista, se tornan susceptibles a la infección por HIV.

Se describieron dos vías separadas del desarrollo de las IDC: la vía mieloide, que genera **células dendríticas mieloides** intersticiales $CD11c^{+}$ y células de Langerhans de la piel, y la vía linfoide, que produce **células dendríticas plasmacitoides** que carecen o expresan niveles muy bajos de CD11 y pueden producir grandes cantidades de interferón-α e interferón β. Parece haber varias subpoblaciones de células dendríticas mieloides, aunque todavía es poco firme.

En ausencia de activación, las células dendríticas carecen de la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86. El antígeno presentado por estas células dendríticas "tolerógenas" causa anergia o deleción de células T, o induce células T reguladoras para secretar citocinas inmunosupresoras como IL-10 y TGFβ. En algunas circunstancias, las células dendríticas también pueden mostrar un fenotipo regulador mediante la secreción de indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), que cataliza la depleción de triptófano, y en ausencia de la cual las células T sufren apoptosis.

En resumen, el escenario para la sensibilización (cebado) de las células T parece ser el siguiente. Las células dendríticas inmaduras periféricas, como las células de Langerhans (véase la Figura 2.7f), que se unen a los queratinocitos cutáneos a través de la expresión de superficie de cadherina E, pueden captar y procesar el antígeno. A medida que la maduración prosigue, pierden su cadherina E y producen colagenasa, presumiblemente para facilitar el paso a través de la membrana basal. Luego se movilizan como "células veladas" en la linfa (Figura 7.16a) antes de establecerse como IDC en la zona paracortical de células T del ganglio



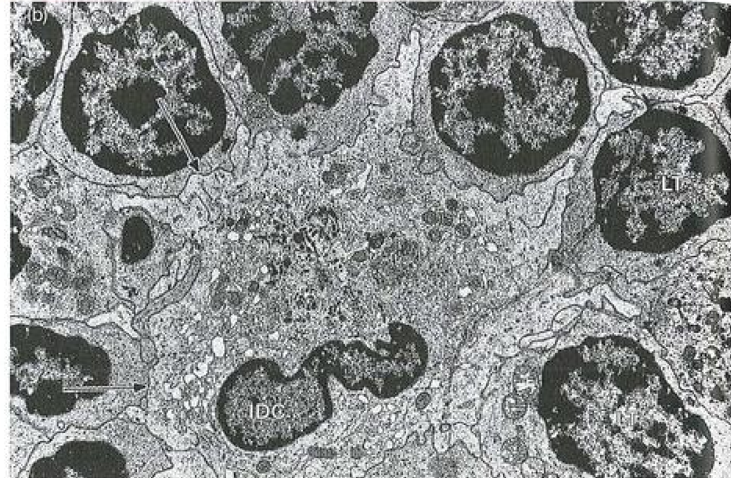


Figura 7.16. Células dendríticas interdigitadas.

a) Microfotografía electrónica de barrido de una célula velada, característica morfológica adoptada por la célula dendrítica interdigitada (IDC) cuando viaja en el área timodependiente del ganglio linfático de rata. b) IDC en el área timodependiente del ganglio linfático de rata. Se forman contactos íntimos con las membranas de superficie *(flechas)* de los linfocitos T (TL) circundantes (×2.000). Al contrario de lo que sucede con estas células dendríticas interdigitadas que presentan el antígeno procesado a las células T, las células dendríticas foliculares en los centros germinativos presentan antígenos intactos a las células B. [(a) Reproducido con autorización de los autores y editores de Kamperdijk E.W.A., Hoefsmit E.Ch.H., Drexhage H.A. y Balfour B.H. [1980] En Van Furth R. [ed.] *Mononuclear Phagocytes, 3 edn.* Rijhoff Publishers, La Haya.]

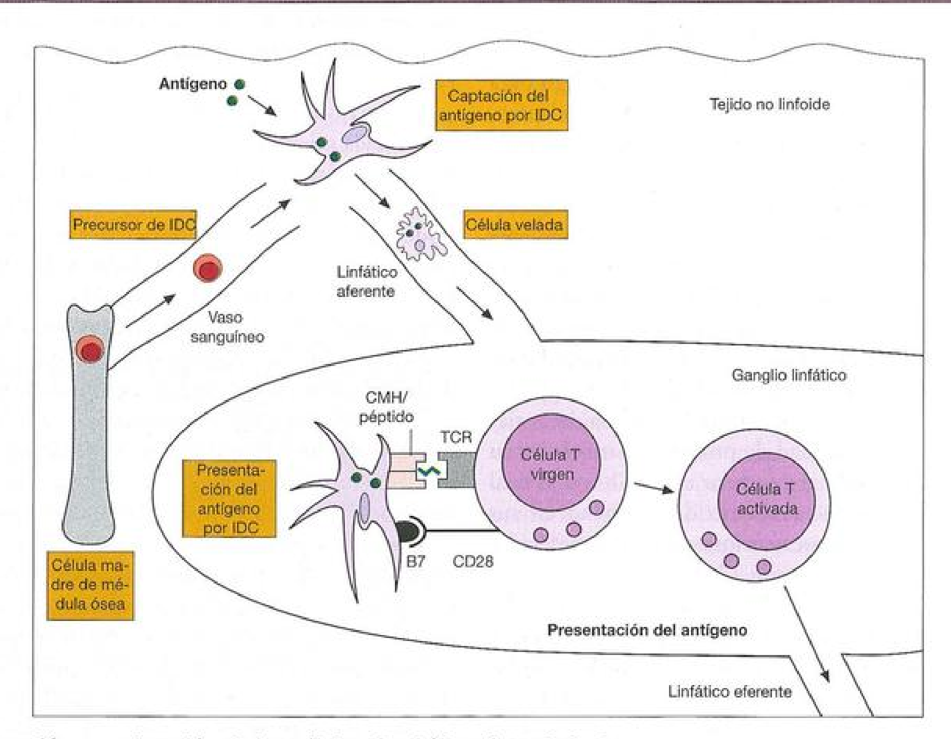


Figura 7.17. Migración y maduración de las células dendríticas interdigitadas.

Los precursores de las células dendríticas interdigitadas (IDC) derivan de las células madre de la médula ósea y circulan por la sangre hasta los tejidos no linfoides. En esta etapa de su vida, estas IDC, por ejemplo, las células de Langerhans de la piel, están especializadas para la captación del antígeno. Con posterioridad, son transportadas por los linfáticos aferentes como células veladas (véase la Figura 7.16a) para localizarse dentro de los tejidos linfoides secundarios (véase la Figura 7.16a) donde expresan niveles elevados de moléculas de clase II del CMH y coestimuladoras como B7 (CD80 y CD86). Estas células son altamente especializadas para la activación de las células vírgenes. La célula T activada puede llevar a cabo su función en el ganglio linfático o, después de la programación, con las moléculas de asentamiento correspondientes, para recircular hacia el tejido apropiado.

linfático de drenaje (Figura 7.16b). Allí, la IDC libera el antígeno con señales coestimuladoras para la estimulación intensa de las células T específicas vírgenes y, con posterioridad, de las células T específicas activadas que aprovechan la gran área de superficie para unirse a los complejos CMH-péptido sobre la membrana de la IDC.

Encontraremos de nuevo las IDC en el Capítulo 11, cuando se analice su función central dentro del timo, donde presentan péptidos propios contra las células T autorreactivas en desarrollo y desencadenan su ejecución apoptósica (conocida con más delicadeza como "deleción clonal").

Las células dendríticas foliculares se unen a inmunocomplejos y estimulan las células B

Los receptores de complemento FcγRII, FcεRII y CR1 (CD35) y CR2 (CD21) en la superficie de las **células dendríticas foliculares** (FDC) no fagocíticas que no poseen moléculas de clase II del CMH les permiten a estas células atrapar de manera muy eficiente al antígeno que está formando complejos y mantenerlo en su forma nativa sobre la superficie durante períodos prolongados. Las células B de memoria pueden ser luego estimuladas por el reconocimiento del antígeno retenido y coestimuladas a través del CD21 de la célula B (véase p. 221), que reconoce los fragmentos del complemento adheridos en la superficie de las FDC. Hay pruebas que sugieren que los antígenos intactos pueden ser retenidos por las FDC durante muchos meses o, tal vez, más tiempo.

Clásicamente, una respuesta secundaria sería iniciada por el antígeno a nivel de las células T *helper*, solo o como un inmunocomplejo, que es captado por las IDC y los macrófagos y después presentados a los TCR como péptido-CMH. Sin embargo, la captura de los inmunocomplejos sobre la superficie de las FDC abre una vía alternativa. Uno a tres días después de la exposición secundaria, las dendritas filamentosas de las células foliculares, a las cuales se unen los inmunocomplejos, forman rosarios que se rompen como estructuras denominadas "icosomas" ("*immune complex-coated bodies*", cuerpos revestidos por inmunocomplejos). Éstos se unen a las células B de los centros germinativos, que después incorporan por endocitosis el antígeno y lo procesan para su presentación por las moléculas de clase II del CHM de la célula B y la estimulación posterior de las células T *helper* para desencadenar la respuesta secundaria.

RESUMEN

Tejido linfoide organizado

- La complejidad de las respuestas inmunitarias se origina en una estructura sofisticada.
- Los ganglios linfáticos filtran y seleccionan la linfa que fluye desde los tejidos corporales, mientras que el bazo filtra la sangre.
- Las áreas de células T y B están separadas, al menos en parte, bajo la dirección de las quimiocinas.
- Las estructuras de las células B aparecen en la corteza de los ganglios linfáticos como folículos primarios que se convierten en folículos secundarios con centros germinativos después de la estimulación antigénica.
- Los centros germinativos, con sus mallas de células dendríticas foliculares, inducen la proliferación de blastos de células B producidos por la exposición antigénica secundaria y dirigen su diferenciación en células de memoria y plasmocitos formadores de anticuerpos.

Inmunidad de las mucosas

- Las células M especializadas que transportan el antígeno proporcionan el ingreso de los antígenos al tejido linfoide de las mucosas.
- El tejido linfoide que protege el tubo digestivo es no encapsulado, pero tiene una estructura ordenada (amígdalas, placas de Peyer, apéndice). También hay colecciones celulares difusas en la lámina propia. Los linfocitos intraepiteliales son sobre todo células T y contienen algunas subpoblaciones especiales, por ejemplo, células que poseen CD8 αα que reconocen antígenos presentados por moléculas no clásicas del CMH.
- Junto con los agregados subepiteliales de células que revisten las superficies mucosas de las vías respiratoria y genitourinaria, estas células y tejidos linfoides forman el "sistema inmunitario secretor" que baña las superficies con anticuerpos protectores, sobre todo IgA.

Otros sitios

- De manera característica, las células T de la piel portan el antígeno leucocítico cutáneo (CLA) y el receptor de quimiocina CCR4.
- La médula ósea es un sitio importante de producción de anticuerpos.
- Las vías respiratorias y el hígado contienen cantidades sustanciales de linfocitos y células fagocíticas.
- El cerebro, la cámara anterior del ojo y los testículos son sitios privilegiados en los cuales pueden ser secuestrados los antígenos de manera segura.

Circulación de linfocitos en los ganglios linfáticos

- La recirculación de linfocitos entre la sangre y los tejidos linfoides es guiada por receptores de asentamiento especializados de la superficie del endotelio de pared alta de las vénulas poscapilares.
- Los linfocitos se adhieren y luego ruedan a lo largo de la superficie de células endoteliales seleccionadas a través de interacciones entre receptores para selectinas, integrinas y quimiocina, y sus ligandos respectivos. La detención del linfocito tras la activación de LFA-1 da por resultado el aplanamiento celular y la ulterior transmigración a través de la célula endotelial.

Procesamiento del antígeno

- Los macrófagos son células presentadoras de antígenos generales para los linfocitos sensibilizados, pero no pueden estimular las células T vírgenes.
- Esto se efectúa por las células dendríticas de origen hematopoyético que procesan el antígeno, migran hasta el ganglio linfático de drenaje y se establecen como células dendríticas interdigitadas. Éstas pueden presentar péptidos derivados de los antígenos a las células T vírgenes e iniciar así respuestas primarias potentes de células T.
- Las células dendríticas foliculares en los centros germinativos unen los inmunocomplejos a su superficie a través de receptores de Ig y C3b. Los complejos tienen una vida prolongada y constituyen una fuente sostenida de estimulación antigénica para las células B.

LECTURAS ADICIONALES

Agace W.W. (2008) T-cell recruitment to the intestinal mucosa. Trends in Immunology 29, 514–522.

Allen C.D. & Cyster J.G. (2008) Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. Seminars in Immunology 20, 14–25.

Barclay A.N. et al. (1997) The Leucocyte Antigen Facts Book, 2nd edn. Academic Press, London.

Batista F.D. & Harwood N.E. (2009) The who, how and where of antigen presentation to B cells. Nature Reviews Immunology 9, 15–27.

Bajénoff M. et al. (2007) Highways, byways and breadcrumbs: directing lymphocyte traffic in the lymph node. Trends in Immunology 28, 346–352.

Bos J.D. (ed.) (2004) Skin Immune System (SIS): Cutaneous Immunology and Clinical Immunodermatology, 3rd edn. Boca Raton. CRC Press.

Bromley S.K., Mempel T.R. & Luster A.D. (2008) Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. Nature Immunology 9, 970–980.

Corr S.C., Gahan C.C. & Hill C. (2008) M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. FEMS Immunology and Medical Microbiology 52, 2–12.

Crispe N. (2009) The liver as a lymphoid organ. Annual Review of Immunology 27, 147–163.

Gonzalez S.F., Degn S.E., Pitcher L.A., Woodruff M., Heesters B. & Carroll M.C. (2011) Trafficking of B cell antigen in lymph nodes. Annual Review of Immunology 29.

Junt T., Scandella E. & Ludewig B. (2008) Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. Nature Reviews Immunology 8, 764–775.

Lefrançois L. & Puddington L. (2006) Intestinal and pulmonary mucosal T-cells: Local heroes fight to maintain the status quo. Annual Review of Immunology 24, 681–704.

Ohtani O. & Ohtani Y. (2008) Structure and function of rat lymph nodes. Archives of Histology and Cytology 71, 69–76.

Pillai S. & Cariappa A. (2009) The bone marrow perisinusoidal niche for recirculating B cells and the positive selection of bone marrow-derived B lymphocytes. Immunology and Cell Biology 87, 16–19.

Pribila J.T., Quale A.C., Mueller K.L. & Shimizu Y. (2004) Integrins and T cell-mediated immunity. Annual Reviews of Immunology 22, 157–180.

Simpson E. (2006) A historical perspective on immunological privilege. Immunological Reviews 213, 12–22.

Wardlaw, A.J., Guillen C. & Morgan A. (2005) Mechanisms of T cell migration to the lung. Clinical and Experimental Allergy 35, 4–7.

Wilke G., Steinhauser G., Grün J. & Berek C. (2010) In silico subtraction approach reveals a close lineage relationship between follicular dendritic cells and BP3(hi) stromal cells isolated from SCID mice. European Journal of Immunology 40, 2165–2173.



CAPÍTULO 8

Activación de los linfocitos

Conceptos clave

A modo de resumen...

Los linfocitos T y B son los efectores fundamentales de la inmunidad adaptativa, mediante el uso de receptores de membrana generados en forma aleatoria para "ver" el antígeno. En ambos casos, el reconocimiento del antígeno cognado produce la expansión clonal de los linfocitos, lo que aumenta el número de células disponibles para montar una respuesta y asegura que el encuentro posterior con el mismo antígeno se alcanzará con mayor fuerza desde el comienzo (es decir, la memoria inmunitaria). Mientras que los receptores de las células B (IgM e IgD de superficie) pueden interactuar directamente con el antígeno, los linfocitos T requieren que el antígeno les sea presentado en el contexto de las moléculas del CMH. La presentación del antígeno a las células T vírgenes (es decir, no estimuladas con anterioridad) tiene lugar en los tejidos linfoides y normalmente se lleva a cabo por las células dendríticas maduras que han migrado desde los tejidos periféricos debido a la exposición a un estímulo de maduración, como un patrón molecular derivado del patógeno (PAMP). Las células dendríticas maduras presentan los antígenos procesados a

Roitt´s Essential Immunology, Twelfth Edition. Peter J. Delves, Seamus J. Martin, Dennis R. Burton, Ivan M. Roitt.

A modo de resumen... *(continuación)*

las células T que exponen los péptidos derivados de esos antígenos sobre las moléculas del CMH. Las células dendríticas también proporcionan coestimulación esencial a las células T en la forma de ligandos de la familia B7 (CD80/CD86) y otras moléculas de superficie; la ausencia de moléculas de coestimulación en la células dendríticas no activa de manera productiva a la célula T y puede provocar la inducción de la tolerancia o la muerte de una célula T que responde. La activación de la célula B también se produce dentro de los ganglios linfáticos y otros tejidos linfoides y es facilitada por células dendríticas foliculares especializadas que, de manera eficiente, capturan y concentran el antígeno que proviene de los tejidos circundantes. Con algunas excepciones, las células B activadas también necesitan la coestimulación de las células T *helper* en forma de citocinas así como del ligando CD40 unido a la membrana, para permitir la proliferación y la diferenciación. Además de la expansión clonal, la activación de una célula B o T también produce la maduración de células efectoras especializadas que producen anticuerpos (en el caso de las células B) o combinaciones particulares de citocinas o moléculas citotóxicas (en el caso de las células T).

Introducción

La respuesta inmunitaria adaptativa comienza como resultado del encuentro entre un linfocito B o T y su antígeno específico que, de manera característica, produce "la activación" del linfocito y un cambio radical en el comportamiento celular: de un estado en reposo, sin división, a uno proliferativo más activo. Esto logra dos objetivos simultáneos: el número de células capaces de responder a un antígeno particular se multiplica (expansión clonal), y estos nuevos reclutas están dotados de la capacidad de producir grandes cantidades de citocinas o anticuerpos para ayudar a repeler al intruso. Debido a los peligros potenciales asociados con la activación inadecuada del linfocito (frente a sustancias "propias" o inocuas), las señales que favorecen la activación de las células T o B suelen precisar la coestimulación por otras células del sistema inmunitario. El requerimiento de la coestimulación eleva el umbral para la activación de los linfocitos y proporciona una medida preventiva contra la autoinmunidad (véase el Capítulo 18). Con frecuencia, el fracaso para recibir las señales coestimuladoras correctas da por resultado la muerte del linfocito que responde mediante la apoptosis.

En capítulos anteriores hemos visto que las células B o T utilizan receptores antigénicos relacionados, pero no obstante distintos, para reconocer al antígeno. La estimulación de las células T o B a través de sus receptores antigénicos respectivos inicia una cascada de acontecimientos de transducción de señales dentro de los linfocitos que responden, las cuales se basan sobre todo en las **proteincinasas**, proteínas que pueden agregar grupos fosfato a otras proteínas. Estos grupos fosfato, aunque insignificantes en el contexto global de la proteína a la que se adhieren, alteran de modo radical la actividad de la proteína (en forma positiva o negativa) o crean sitios de unión para acoplarse con otras proteínas. De esta manera, la activación de quinasas particulares actúa como un interruptor para alterar el comportamiento celular. Por lo tanto, los receptores de membrana para el antígeno simplemente actúan como interruptores externos para señales que permitan que los linfocitos T y B sean llamados al deber en el momento oportuno. Gran parte de la complejidad de la señalización de los receptores de las células T y B gira en torno a la cuestión de si el interruptor debe ser activado o desactivado (es decir, cuándo responder o no).

Aunque existen diferencias en la naturaleza de las cinasas específicas que transmiten señales desde los receptores de las células B y T, hay también muchas similitudes. En ambos casos, estos fenómenos de transducción de señal determinan la activación de varios de los mismos factores de transcripción, el ingreso en el ciclo de división celular y la expresión de una serie de proteínas nuevas por el linfocito activado que proveen a estas células de funciones características de las efectoras.

Con frecuencia, la agrupación de los receptores de membrana conduce a su activación

Todas las células utilizan receptores presentes en sus membranas citoplasmáticas para extraer información del entorno. Esta información se propaga dentro de la célula mediante moléculas de señalización y le permite elaborar la respuesta apropiada, sea la reorganización del citoesqueleto celular (para facilitar el movimiento), la expresión de nuevos productos génicos, el aumento de la adhesividad celular o todos los anteriores. En muchos casos, la ocupación del receptor con su ligando específico (si éste es un factor de crecimiento, una hormona o un antígeno) causa el cambio conformacional o de otro tipo dentro del receptor que favorece el reclutamiento de proteínas adaptadoras citoplasmáticas a la porción del receptor expuesto hacia el citoplasma. Como muchos receptores de la membrana citoplasmática son proteincinasas, o pueden reclutarlas al unirse con sus ligandos específicos, la estimulación de estos receptores lleva típicamente a la fosforilación de las regiones dentro del receptor en contacto con el citoplasma (es decir, la cola citoplasmática) o de las proteínas asociadas.

En el caso de las células B y T, sus receptores en sí no tienen ninguna actividad enzimática intrínseca, pero se asocian con moléculas accesorias invariables (cadenas $\gamma\delta\epsilon$ y ξ de CD3 en el caso del receptor de la célula T [TCR] y el complejo Ig-$\alpha\beta$ en el caso del receptor de la célula B [BCR]) que

pueden llamar la atención de una clase particular de cinasas. De fundamental importancia en esta atracción es la presencia de motivos especiales denominados **ITAM** ***(immunoreceptor tirosina-based activation motifs*: motivos de activación de inmunorreceptor basados en tirosina)** dentro de las colas citoplasmáticas de esas moléculas accesorias (véase también Capítulo 4). La fosforilación de los ITAM en los residuos de tirosina, en respuesta a la estimulación del TCR o del BCR, permite que estos motivos interactúen con proteínas adaptadoras que tienen una afinidad por los motivos de tirosina fosforilada, que por eso inicia la transducción de la señal. Nos dedicaremos a los acontecimientos de señalización que tienen lugar tras el encuentro de una célula T o B con el antígeno.

Los linfocitos T y las células presentadoras de antígeno interactúan a través de varios pares de moléculas accesorias

Antes de profundizar en los fenómenos de señalización dirigidos por el TCR, es importante recordar que las células T sólo pueden reconocer el antígeno cuando se presentan dentro de la hendidura de unión al péptido de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Además, mientras el TCR es el modo primario por el cual las células T interactúan con el complejo CMH-péptido, estas células también expresan correceptores para las moléculas del CMH (CD4 o CD8) que definen las subpoblaciones funcionales de células T. Recuérdese que las moléculas CD4 actúan como correceptores para las moléculas de clase II del CMH y se encuentran en las poblaciones de células T *helper* que proporcionan "ayuda" para la activación y la maduración de las células B y las células T citotóxicas (Figura 8.1). Las moléculas CD8 actúan como correceptores para las moléculas de clase I del CMH y son características de las células T citotóxicas, que pueden destruir las células infectadas por virus o las precancerosas (Figura 8.1). Sin embargo, obsérvese que la afinidad de un TCR dado para su complejo específico péptido antigénico-CMH es relativamente baja (Figura 8.2). De tal modo, sólo puede lograrse una asociación suficientemente estable con una célula presentadora de antígeno (CPA) por la interacción de varios pares complementarios de moléculas accesorias, como LFA-1/ICAM-1, CD2/LFA-3, y así sucesivamente (Figura 8.3). Estas moléculas de adhesión posibilitan que las células T se asocien con células dendríticas y otras CPA con el fin de inspeccionar los péptidos que se presentan dentro de las moléculas del CMH. No obstante, estos acoplamientos moleculares no tienen necesariamente relación con la adherencia intercelular sola; algunas de esas interacciones también proporcionan la coestimulación esencial para la activación apropiada del linfocito.

Es característico que linfocitos no estimulados no sean adherentes, pero se adhieran con rapidez a los componentes de la matriz extracelular o a otras células (como CPA) segundos después de enfrentarse con las quimiocinas o el antígeno. Las integrinas como LFA-1 y VLA-4 parecen ser particularmente importantes para la adherencia del linfocito. La facilidad con

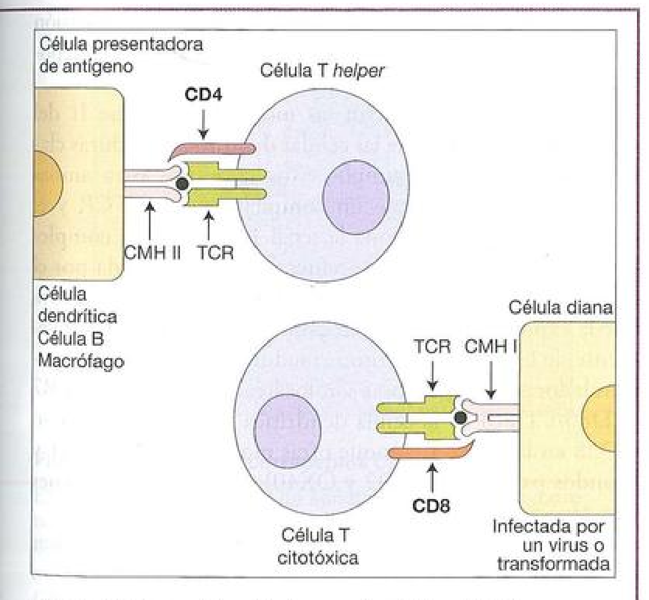


Figura 8.1. Las subpoblaciones de células T *helper* y citotóxicas están restringidas por el CMH.

El CD4 en las células T *helper* actúa como correceptor para las moléculas de clase II del CMH y contribuye a estabilizar la interacción entre el TCR y el complejo péptido-CMH; el CD8 en las células T citotóxicas realiza una función similar mediante la asociación con moléculas de clase I del CMH.

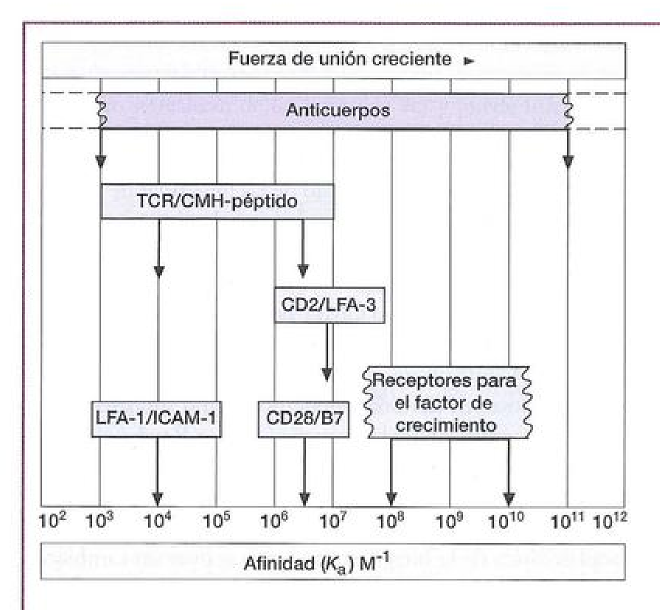


Figura 8.2. Afinidades relativas de los pares moleculares que intervienen en las interacciones entre los linfocitos T y las células presentadoras de antígeno.

Con fines comparativos, se muestran las variaciones de afinidades para los factores de crecimiento y sus receptores y de los anticuerpos. (Basado en Davies M.M y Chien Y.-H. [1993], *Current Opinion in Immunology* **5**, 45.)

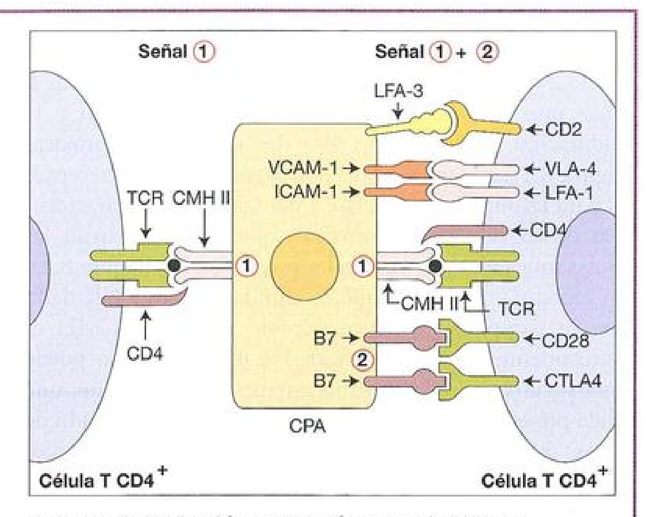


Figura 8.3. Activación de las células T en reposo.

La interacción de las moléculas coestimuladoras conduce a la activación del linfocito T en reposo por la célula presentadora de antígenos (CPA) cuando el receptor de la célula T (TCR) es ocupado por su complejo antígeno-CHM. La participación de la señal 1 del TCR sin la señal 2 coestimuladora acompañante conduce a la anergia. Obsérvese que una célula T citotóxica, más que una célula T *helper*, implicaría el acoplamiento de CD8 a la molécula de clase I del CMH. La señal 2 es proporcionada a una célula T en reposo principalmente a través de la ocupación de CD28 en la célula T por B7.1 o B7.2 en la CPA. CTLA-4 compite con CD28 para los ligandos B7 y tiene una afinidad mucho más alta que CD28 para estas moléculas. La ocupación de CTLA-4 por B7 regula negativamente la señal 1. ICAM-1/2, (*intercellular adhesion molecule*) molécula de adhesión intercelular -1/2; LFA-1/2, (*lymphocyte function associated molecule*) molécula asociada a la función del linfocito-1/2; VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*), molécula de adhesión a las células vasculares 1; VLA-4, antígeno muy tardío-4 (*very late antigen*).

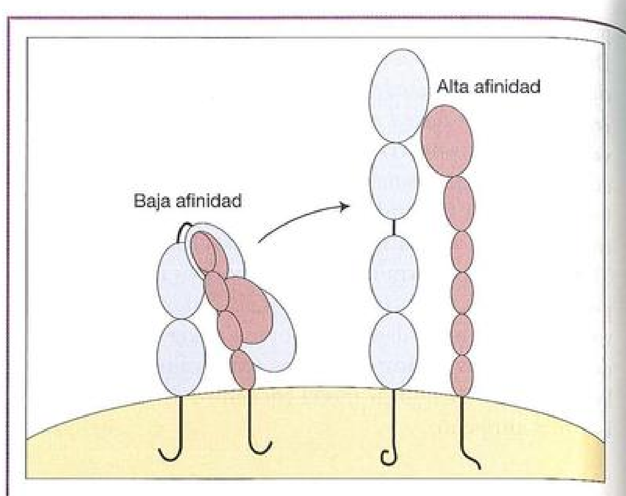


Figura 8.4. Activación de la integrina.

Las integrinas, como LFA-1, pueden adoptar estructuras diferentes que se asocian con afinidades distintas. La conformación incurvada de la pieza de la cabeza tiene una afinidad baja por el ligando, pero puede transformarse rápidamente en la estructura extendida de alta afinidad por señales de activación que actúan sobre las colas citoplasmáticas de las subunidades α y β de la integrina; este proceso es conocido como señalización "desde adentro hacia afuera" (*inside-out*).

la cual los linfocitos pueden modificar su adhesividad parece estar relacionada con la capacidad de las integrinas de cambiar de conformación desde un estado cerrado de baja afinidad hasta uno más abierto de afinidad elevada (Figura 8.4). Así, cuando tiene lugar el encuentro de una célula T con una CPA que despliega un complejo CMH-péptido apropiado, aumenta con rapidez la afinidad de LFA-1 para ICAM-1 y esto ayuda a estabilizar la interacción entre la célula T y la CPA. Este complejo se conoce, en términos modernos, como **sinapsis inmunitaria**. La activación de la pequeña GTPasa **Rap1** por la estimulación de TCR parece contribuir al cambio rápido en la adhesividad de la integrina. No se conoce bien el modo en que Rapl logra esto, pero es probable que la modificación de la cola citoplasmática de la integrina sirva para activar un cambio en la estructura de los dominios extracelulares de ésta, proceso que se ha denominado señalización "desde adentro hacia afuera" (*inside-out*).

La activación de las células T requiere dos señales

La estimulación del TCR por el CMH-péptido (que puede ser imitada por anticuerpos dirigidos contra el TCR o el complejo CD3) no es suficiente por sí misma para activar totalmente a las células T *helper* en reposo. Sin embargo, con el agregado de interleucina-1 (IL-1) se induce el RNA y la síntesis de proteínas, la célula aumenta de tamaño con un aspecto similar a los blastos, comienza la síntesis de interleucina-2 (IL-2) y aquélla pasa de la fase G0 a G1 del ciclo de división celular. Por lo tanto, para la activación de una célula T en reposo se requieren **dos señales** (Figura 8.3).

El antígeno asociado con las moléculas de clase II del CMH en la superficie de las células dendríticas maduras claramente es capaz de cumplir estos requisitos para ambas señales. La formación de un complejo entre el TCR y el CMH-péptido proporciona la señal 1, a través del complejo receptor- CD3, y esto se refuerza en gran medida por el acoplamiento de CD4 con el CMH. La célula T ahora queda expuesta a una señal coestimuladora (señal 2) proveniente de la células dendríticas madura. Las moléculas coestimuladoras más poderosas son los ligandos de la familia B7 (CD80/CD86) en la célula dendrítica que interactúan con CD28 en la célula T, aunque otras moléculas (como IL-1 y ligandos para ICOS, CD2 y OX40) también pueden tener esta capacidad.

Recuérdese del Capítulo 1 que las células dendríticas inmaduras, que no han sido expuestos a los PAMP o DAMP, son incapaces de activar productivamente las células T. Esto se debe a la ausencia relativa de moléculas coestimuladoras, como CD80/CD86 sobre la superficie de las células dendríticas inmaduras. Sin embargo, un incremento intenso en la expresión de estas moléculas se produce como consecuencia de la maduración de la célula dendrítica ulterior a la estimulación de sus receptores de reconocimiento de patrón con un PAMP o un DAMP. Las citocinas infla-



matorias (como IL-1, GM-CSF y TNFα) que son producidas por macrófagos y neutrófilos en los estadios iniciales de infección también son capaces de convertir las células dendríticas inmaduras escasamente coestimuladoras en células dendríticas maduras capaces de proporcionar las señales necesarias. La activación de las células T en reposo puede ser bloqueada por anticuerpos anti-B7; esto torna a la célula T **anérgica**, es decir, no reactiva a cualquier estimulación nueva por el antígeno. Como veremos en los capítulos siguientes, el principio de que dos señales activan, pero una puede inducir anergia en una célula específica para el antígeno, brinda un mecanismo posible para el tratamiento inmunosupresor dirigido. Sin embargo, a diferencia de los linfocitos T en reposo, **las células T activadas proliferan en respuesta a una *única* señal.**

Las moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1 y LFA-3 no son por sí mismas coestimuladoras, sino que aumentan el efecto de otras señales (Figura 8.3), una diferencia importante. Los acontecimientos de señalización tempranos comprenden la agregación de **"balsas" (*rafts*) lipídicas**, compuestas por subdominios de membrana con alto contenido de colesterol y glucoesfingolípidos. Las moléculas de la membrana celular que intervienen en la activación se concentran dentro de estas estructuras.

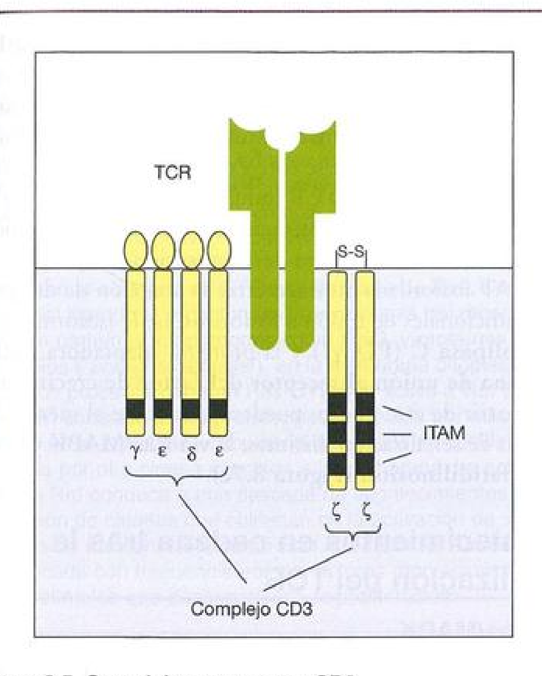


Figura 8.5. Complejo correceptor CD3.

El TCR no tiene actividad de señalización intrínseca, pero señala a través del complejo CD3 asociado. Obsérvese que el complejo CD3 se considera que está compuesto de una subunidad formada cada una por una CD3γ, una CD3δ y dos CD3ε y dos subunidades CD3ξ unidas por enlace disulfuro. Como se muestra en la figura, todas las subunidades del correceptor CD3 contienen motivos de activación basados en tirosina (ITAM) del inmunorreceptor que pueden fodsforilarse por cinasas activadas tras la estimulación del TCR. La fosforilación en tales motivos crea sitios de unión para otras moléculas de señalización que pueden propagar las señales de activación de la célula T.

Activación del complejo receptor de células T

Ahora consideremos una situación en la que una célula T ha encontrado una célula dendrítica que expone la combinación péptido-CMH correcta y ha compartido con la célula dendrítica que muchos de los TCR sobre la célula T están ocupados con un número similar de moléculas péptido-CMH de alta afinidad en la célula presentadora de antígeno. Esto estabiliza enormemente la interacción entre la célula T y la célula dendrítica de modo que la duración del encuentro (el tiempo de permanencia) será suficiente para activar la célula T. Pero ¿cuál es el acontecimiento activador real? Dicho de otro modo, ¿cómo registra el complejo TCR que se ha puesto en marcha el interruptor?

A pesar de la intensa investigación, aún no tenemos una respuesta clara a esta pregunta, pero parece que tanto la agregación del complejo del receptor de la célula T, así como los cambios conformacionales dentro del complejo, desempeñan funciones clave en la iniciación de la señal. Recuérdese del Capítulo 4 que el complejo receptor de células T se compone del TCR propiamente dicho y del **complejo correceptor CD3**. Este último contiene CD3γδεξ, que tiene los motivos de señalización (ITAM) necesarios para la propagación de las señales al interior de la célula (Figura 8.5). Evidencias recientes sugieren que en una célula T en reposo las colas citoplasmáticas de las moléculas CD3ε y CD3ξ están alojadas en la hoja interna de la membrana citoplasmática, que protege sus ITAM de la cinasa denominada Lck (que se analizará en la sección siguiente), que es necesaria para poner en marcha la señal de transducción. Al parecer, las interacciones CMH-TCR estables pueden liberar las colas CD3ε y CD3ξ de la membrana, lo que las hace accesibles a la fosforilación. Como veremos en la sección siguiente, las cascadas de señalización que resultan de la estimulación del TCR pueden ser bastante complejas (Figura 8.6), pero se realizan de un paso a la vez y puede inferirse un cierto orden en el caos aparente.

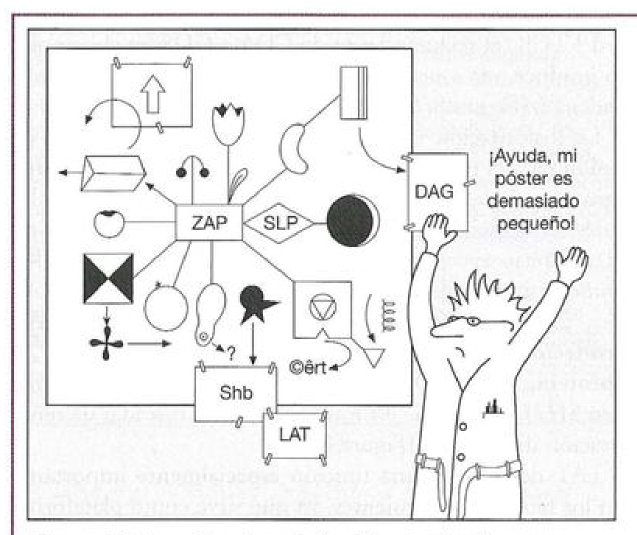


Figura 8.6. Las vías de señalización pueden tornarse bastante complejas.

(Reproducido con autorización de Zolnierowicz S. y Bollen M. [2000], *EMBO Journal* **19**, 483.)

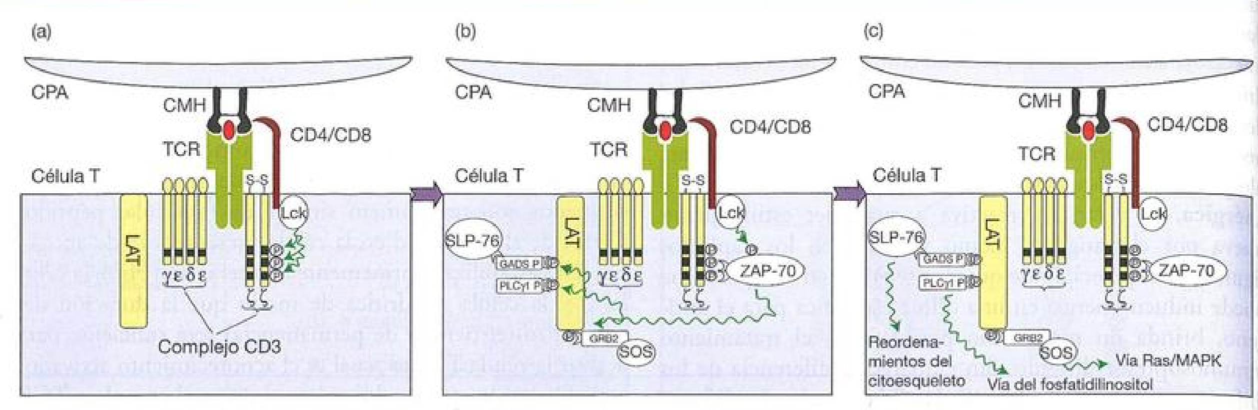


Figure 8.7. Acontecimientos de señalización posteriores a la ocupación del receptor de célula T (TCR).

a) La ocupación del TCR con la combinación correcta péptido-CMH conduce al reclutamiento de CD4/CD8 en el complejo TCR a través de interacciones con el CMH sobre la célula presentadora de antígeno (CPA) (obsérvese que, para mayor simplicidad, no se muestra la coestimulación entre B7 y CD28). Dado que CD4 y CD8 están asociados constitutivamente con la Lck cinasa, esto acerca la Lck a los ITAM dentro del complejo correceptor CD3. Entonces, Lck fosforila CD4 en varios sitios, que crea los sitios de unión para el reclutamiento de la cinasa ZAP-70. b) El reclutamiento de ZAP-70 en el complejo correceptor CD3 conduce a su fosforilación y activación por Lck. La ZAP-70 activa propaga las señales del TCR a través de la fosforilación del LAT (conector para la activación de las células T) en varios sitios. El LAT fosforilado actúa como plataforma para el reclutamiento de varios complejos de señalización, como se muestra. c) Las moléculas reclutadas en LAT estimulan tres cascadas de señalización principales, como se muestra, y logran de modo cooperativo la activación de la célula T. Véase el texto para mayores detalles.

La fosforilación de los residuos tirosina de la proteína es un acontecimiento temprano en la señalización de las células T

La interacción entre el TCR y el complejo CMH-péptido está en gran medida reforzada por el reclutamiento de cualquier correceptor para las moléculas del CMH, CD4 o CD8 en el complejo. Además, como las colas citoplasmáticas de CD4 y CD8 se asocian de manera constitutiva con **Lck**, una proteína tirosincinasa (PTK) que puede fosforilar los tres ITAM dispuestos en tándem dentro de las **cadenas** ξ del TCR, el reclutamiento de CD4 o CD8 en el complejo produce una asociación estable entre Lck y su sustrato, la cadena ξ (Figura 8.7a).

La fosforilación de la cadena ξ por Lck crea sitios de unión para el reclutamiento de otra PTK, la **ZAP-70 (proteína asociada a la cadena zeta de 70 kDa)**, en el complejo de señalización del TCR. El reclutamiento de ZAP-70 en el complejo receptor ocasiona la activación de esta PTK como resultado de la fosforilación mediada por Lck. A su vez, ZAP-70 fosforila dos proteínas adaptadoras, **LAT (conector para la activación de las células T) y SLP76 (proteína de 76 kDa del leucocito que contiene el dominio SH2)**, que puede estimular el flujo de cascadas de señalización divergentes (Figura 8.7b).

LAT desempeña una función especialmente importante en los fenómenos siguientes, ya que sirve como plataforma para el reclutamiento de varios actores adicionales en el complejo TCR. LAT contiene muchos residuos de tirosina que, con la fosforilación por ZAP-70, pueden ligarse a otras proteínas adaptadoras a través de los motivos (denominados dominios SH2) que se unen a los residuos fosfotirosina. Así, la fosforilación de LAT produce el reclutamiento de **GADS (proteína adaptadora relacionada con GRB2)**, que está constitutivamente asociada con SLP76. Esta última ha sido vinculada con los reordenamientos del citoesqueleto debido a su capacidad de asociarse con Vav1 y NCK (Figura 8.7b). Así, la estimulación del TCR induce cambios en la forma de las células que más probablemente se deben al reclutamiento de SLP76 en el complejo de señalización del TCR.

La LAT fosforilada también atrae la atención de dos proteínas adicionales de unión a fosfotirosina: la isoforma γl de la **fosfolipasa C (PLCγ1)** y la proteína adaptadora **GRB2 (proteína de unión al receptor del factor de crecimiento 2)**. A partir de este punto, pueden producirse al menos dos cascadas de señalización distintas: la **vía Ras/MAPK** y la **vía del fosfatidilinositol (Figura 8.7c)**.

Acontecimientos en cadena tras la señalización del TCR

Vía Ras/MAPK

Ras es una proteína G pequeña que se asocia constitutivamente con la membrana citoplasmática y es activada a menudo en respuesta a estímulos diversos que promueven la división celular (Figura 8.8). Ras puede hallarse en dos estados: unida a GTP (activa) y unida a GDP (inactiva). Por lo tanto, el intercambio de GDP por GTP estimula la activación de Ras y permite a esta proteína reclutar uno de sus efectores de la cadena, Raf. ¿Cómo es que la estimulación del TCR produce la activación de Ras? Una de las maneras por la cual puede lograrse la activación de Ras es a través de la actividad de los **GEF (factores de intercambio del nucleótido guanina)**, que favorece el intercambio de GDP por GTP en Ras. Uno de estos GEF, el SOS (*son of seven-*

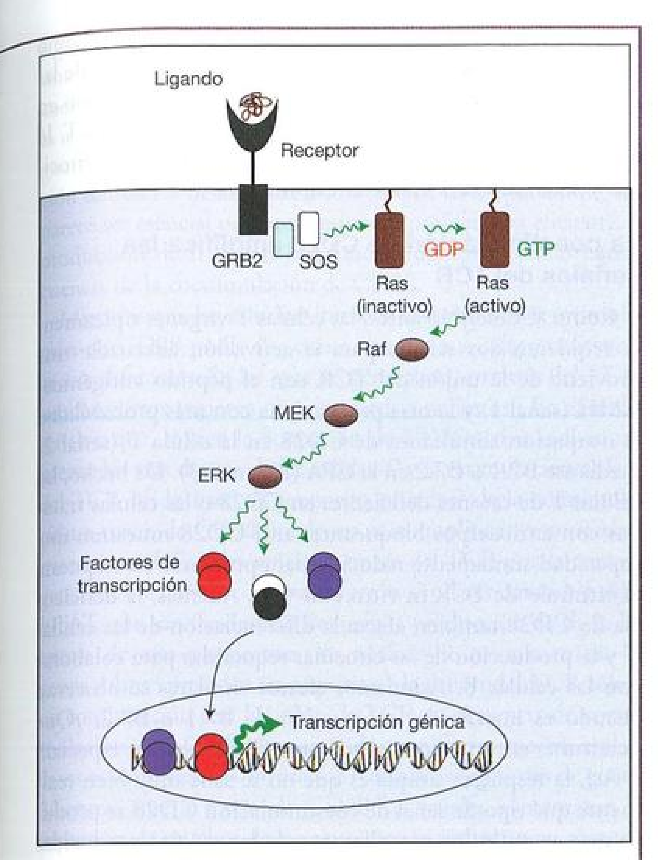


Figura 8.8. Vía Ras/MAP cinasa.

La regulación de la actividad de Ras controla las cascadas de amplificación de las cinasas. Algunos receptores de la superficie celular emiten señales a través de vías reguladas por Ras. Ras cicla entre Ras-GDP inactivo y Ras-GTP activo, regulado por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), que promueven la conversión de Ras-GDP a Ras-GTP, y por proteínas activadoras de la GTPasa (GAP), que aumentan la actividad de GTPasa intrínseca de Ras. Con la unión del ligando al receptor, las tirosincinasas del receptor reclutan proteínas adaptadoras, como Grb2, y proteínas GEF, como Sos ("*son of sevenless*"), en la membrana citoplasmática. Estos procesos generan Ras-GTP que activa a Raf cinasa (también conocida como proteincinasa activada por mitógeno, MAPK) en la membrana citoplasmática donde se convierte en activada por otra cinasa asociada a la membrana. La activación de Raf conduce a una cascada de acontecimientos de activación de cinasas que culminan en la activación de varios factores de transcripción, como Elk1. La cascada Ras/MAPK es invocada con frecuencia por los factores de crecimiento y otros estímulos que desencadenan la proliferación.

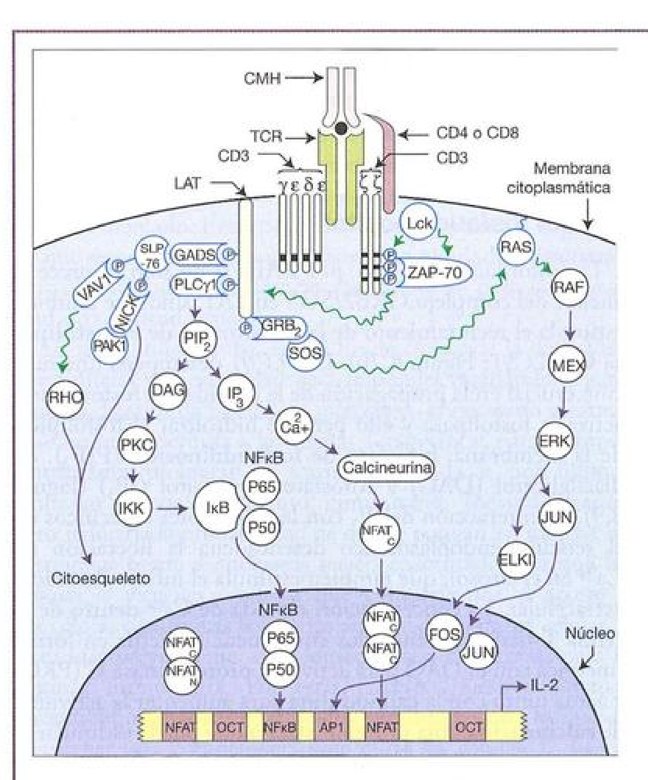


Figura 8.9. Generalidades de la señalización basada en el TCR.

Las señales a través del complejo CMH-antígeno (señal 1) y el coestimulador B7 (señal 2) inician una cascada de acontecimientos de activación de proteincinasas y una elevación del calcio intracelular, lo cual activa los factores de transcripción que controlan la entrada en el ciclo celular desde G0 y regulan la expresión de IL-2 y muchas otras citocinas. El reclutamiento estable de CD4 o CD8 en el complejo TCR inicia la cascada de transducción de la señal a través de la fosforilación de los motivos ITAM dispuestos en tándem dentro de las cadenas ξ de CD3, que crea los sitios de unión para la cinasa ZAP-70. Los acontecimientos posteriores se ordenan a través de la fosforilación de LAT mediada por ZAP-70; el reclutamiento de diversos complejos de señalización en LAT lleva a la activación de las vías de señalización Ras- /MAPK y PLCγ1. Estas vías culminan en la activación de un espectro de factores de transcripción como NFκB, NFAT y heterodímeros Fos/Jun. Otras moléculas también pueden contribuir a esta vía, pero se han omitido en la figura para mayor claridad. Véase el texto para más detalles. DAG, diacilglicerol; ERK, cinasa regulada por señales extracelulares; IP3, trifosfato de inositol; LAT, conector de las células T activadas; NFκB, factor nuclear κB ; NFAT, factor nuclear de células T activadas; OCT-1, factor fijador de octámeros; Pak1, cinasa activada por p21; PIP_2, difosfato de fosfatidilinositol; PKC, proteincinasa C; PLC, fosfolipasa C; SH2, dominio 2 de homología con Src; SLAP, fosfoproteína asociada a SLP-76; SLP-76 fosfoproteína de 76 kDa específica de leucocito que contiene el dominio SH2; ZAP-70, proteincinasa asociada a la cadena ξ → transducción de la señal positiva.

less), es reclutado en el LAT fosforilado por la vía de la proteína de unión a la fosfotirosina GRB2 (Figura 8.7). Así, la fosforilación de LAT por ZAP-70 conduce directamente al reclutamiento del complejo GRB2/SOS en la membrana citoplasmática, donde puede estimular la activación de Ras mediante la promoción del intercambio de GDP por GTP.

En su estado unido al GTP, Ras puede reclutar una cinasa, Raf **(también denominada MAPKKK, ¡proteína cinasa cinasa cinasa asociada a mitógeno!)**, en la membrana citoplasmática, que pone luego en movimiento una serie de procesos adicionales de activación de cinasa que culminan con la fosforilación del factor de transcripción Elk1, además de muchos otros factores de transcripción. La fosforilación de Elk1 permite la translocación de esa proteína al núcleo y produce la expresión de Fos, otro factor de transcripción. La aparición de Fos causa la formación de heterodímeros con

Jun para formar el complejo AP-1, que tiene sitios de unión sobre el promotor de IL-2, así como sobre muchos otros genes (Figura 8.9). La deleción de los sitios de unión AP-1 del promotor de IL-2 anula el 90% de la actividad del potenciador IL-2.

Vía del fosfatidilinositol

La fosforilación de LAT por ZAP-70 no sólo favorece el anclaje del complejo GRB2/SOS en LAT, sino que también estimula el reclutamiento de la isoforma γ1 de la **fosfolipasa C** (PLCγ1; Figura 8.7b). La PLCγ1 desempeña una función crucial en la propagación de la cascada. Su fosforilación activa la fosfolipasa y ello permite hidrolizar el fosfolípido de la membrana, **bifosfato de fosfatidilinositol (PIP_2)**, en diacilglicerol (DAG) y trifosfato de inositol (IP_3) (Figura 8.9). La interacción de IP_3 con los receptores específicos en el retículo endoplasmático desencadena la liberación de Ca^{2+} en el citosol, que también estimula el influjo del calcio extracelular. La concentración **elevada de Ca^{2+}** dentro de la célula T tiene al menos dos consecuencias: actúa en forma sinérgica con el DAG para activar la **proteincinasa C** (PKC) y actúa junto con la **calmodulina** para aumentar la actividad de **calcineurina**, una proteinfosfatasa que puede estimular la activación de un factor de transcripción importante (NFAT) requerido para la producción de IL-2.

La activación de PKC dependiente de Ca^{2+} por DAG es decisiva para la activación de otro factor de transcripción, NFκB. Éste es en realidad una familia de factores de transcripción relacionados que participan en la regulación de transcripción de muchos genes, que incluyen los de citocinas (como IL-2) y los de genes que pueden favorecer la supervivencia celular por medio de señales bloqueadoras que promueven la apoptosis.

Control de la transcripción del gen de *IL-2*

La transcripción de IL-2 es uno de los elementos claves para evitar que la célula T señalada incurra en anergia y sea controlada por múltiples sitios de unión para los factores de transcripción en la región promotora (Figura 8.9).

Bajo la influencia de la calcineurina, el componente citoplasmático del factor nuclear de las células T activadas (**$NFAT_c$**, n*uclear* f*actor of* a*ctivated* T-*cells*) se fosforila y esto permite la translocación al núcleo, donde forma un complejo binario con $NAFT_n$, su compañero, que se expresa constitutivamente en el núcleo. El complejo NAFT se une a dos sitios reguladores diferentes de IL-2 (Figura 8.9). Obsérvese que el efecto de la calcineurina es bloqueado por los agentes que actúan contra las células T, como ciclosporina y tracolimús (véase el Capítulo 16). Las vías dependientes de PKC y calcineurina actúan en forma sinérgica para activar la IκB cinasa (IKK) de múltiples subunidades, que fosforila al inhibidor IκB y lo dirige para su ubicuitinación y su degradación posterior por el proteasoma. La pérdida de IκB del complejo IκB-NFκB expone la señal de localización nuclear sobre el factor de transcripción NFκB, que entonces ingresa rápidamente en el núcleo. Además, el factor de transcripción ubicuo **Oct-1** interactúa con motivos de secuencia de unión a octámeros específicos.

Nos hemos centrado en la transcripción de IL-2 como una consecuencia temprana y central de la activación de las células T, pero más de 70 genes son expresados de novo en el curso de las 4 horas de la activación de las células T, lo cual conduce a la proliferación y la síntesis de varias citocinas y sus receptores (véase el Capítulo 9).

La coestimulación de CD28 amplifica las señales del TCR

Como se describió antes, las células T vírgenes típicamente requieren dos señales para la activación adecuada: una proviene de la unión del TCR con el péptido antigénico-CMH (señal 1) y la otra proporciona con más probabilidad la ocupación simultánea de CD28 en la célula T (señal 2) mediante B7.1 o B7.2 en la CPA (Figura 8.3). De hecho, las células T de ratones deficientes en CD28 o las células tratadas con anticuerpos bloqueantes anti-CD28 muestran una capacidad sumamente reducida para proliferar en respuesta al estímulo de TCR in vitro e in vivo. Además, la deficiencia de CD28 también afecta la diferenciación de las células T y la producción de las citocinas requeridas para colaborar con las células B. Asimismo, efectos similares se observan cuando es interferida la expresión de B7.1 o B7.2. ¿Qué determina entonces que el receptor CD28 sea tan especial?

Así, la respuesta simple es que no se sabe muy bien realmente qué tipo de señal de coestimulación CD28 se produce que es radicalmente diferente de las señales producidas por estimulación del complejo TCR, ya que se activan varias de las mismas vías de señalización. CD28 se expresa en la membrana citoplasmática de las células T vírgenes así como de las células T activadas como un homodímero de 44 kDa, el dominio citoplasmático que carece de toda actividad enzimática intrínseca. Sin embargo, la cola citoplasmática de CD28 contiene motivos basados en tirosina que, tras la fosforilación en los residuos, recluta fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y Grb2. De este modo, tras el entrecruzamiento de CD28, las señales se propagan a través de PI3K que pueden afectar a múltiples vías de señalización, como la supervivencia celular, el metabolismo celular y la síntesis de proteínas. La activación de PI3K mediada por CD28 es importante para la supresión de la apoptosis, que parece lograrse a través de la diana específica en etapas posteriores de esta vía, la cinasa PKB/Akt. Esta cinasa regula factores de transcripción que traen como consecuencia el aumento de la expresión de la proteína antiapoptósica Bcl-x_L. Mediante la sobreexpresión de Bcl-x_L, la estimulación de CD28 bloquea las señales mediadas por TCR que, de lo contrario, daría lugar a la apoptosis (un proceso denominado **muerte celular inducida por la activación**) (véase Videoclip 2).

Grb2 se acopla en el mismo motivo en la cola citoplasmática de CD28 que PI3K y puede activar la vía Ras a través de su factor de intercambio del nucleótido guanina SOS, como se mencionó antes. Grb2 también se ha implicado en la propagación de otras señales durante la activación de las células T a través del reclutamiento de Vav, que analizaremos más adelante.

Estudios recientes también sugieren que las señales CD28 se alimentan de la vía de señalización de TCR en el nivel del adaptador SLP-76, la provisión de señales que amplifican la señalización del TCR de una manera cuantitativa. Aunque

sigue sin conocerse la identidad de la cinasa, se ha sugerido que una cinasa activada por CD28 fosforila la SLP-76 durante la coestimulación y esto conduce al mayor reclutamiento y la activación de Vav, un factor de intercambio del nucleótido guanina que puede promover en los pasos posteriores la activación de Rac1 y de la cinasa c-Jun (JNK). La activación de Vav parece ser esencial para una respuesta proliferativa eficiente, la producción de IL-2 y la señalización del calcio como consecuencia de la coestimulación de CD28.

Mientras que los estudios iniciales sugerían que la estimulación de CD28 podía dar como resultado señales *cualitativamente* diferentes de las que se generaban a través del TCR, muchos otros sugieren que esto podría no ser así. En cambio, señalan que, si bien la ocupación de CD28 activa individualmente las vías dentro de las células T y la estimulación aislada del TCR no lo hace, el propósito principal de la coestimulación a través de CD28 puede ser para amplificar *cuantitativamente o estabilizar* las señales a través del TCR por la convergencia sobre factores de transcripción similares como NFκB y NFAT, que son fundamentales para la producción de IL-2. En apoyo de esta perspectiva, los análisis de micromatrices de genes sobreexpresados en respuesta a la unión del TCR solo y en comparación con la unión de TCR en presencia de coestimulación con CD28 pusieron de manifiesto que en ambos casos eran expresadas, en esencia, las mismas cohortes de genes. Mientras que a través de CD28 las señales aumentaron la expresión de muchos de los genes que se activaban en respuesta a la unión del TCR, no se expresaba ningún gen nuevo. Esto indica que puede requerirse la coestimulación de CD28 para transponer los umbrales de la señalización que no son alcanzables exclusivamente por medio de la unión del TCR. ¡Recuerde que los automóviles de generaciones anteriores necesitaban una mezcla ligeramente más rica de combustible para ayudar a poner en marcha un motor frío! La coestimulación de las células T vírgenes por CD28 puede cumplir una función similar, que deja de ser necesaria cuando esas células "han entrado en calor" como resultado del estímulo anterior.

El requisito de dos señales para la activación de las células T es una manera muy buena de reducir al mínimo la probabilidad de que las células T respondan a antígenos propios. Debido a que los receptores de las células T se generan al azar y pueden, en principio, reconocer a casi cualquier péptido corto, el sistema inmunitario necesita una forma de permitir que una célula T distinga ante qué péptidos en particular (es decir, no propios) debe responder, mientras que no debe hacerlo ante otros (es decir, derivados de lo propio). El hecho de que las moléculas CD80/CD86 están sobreexpresadas sólo en las CPA que han sido estimuladas con un PAMP proporciona una manera bastante ingeniosa de asegurar que sólo las CPA que han encontrado microorganismos son capaces de presentar de modo adecuado los péptidos a las células T. Una vez más, vemos la mano guiadora del sistema inmunitario innato, que ayuda a clasificar cuáles representan un "peligro" y cuáles no.

Atenuación de la exacerbación de las células T

Con frecuencia reiteramos la premisa de que ningún organismo que se precie permitiría la actividad de una empresa en expansión, como es la de una población de células T en proliferación, sin algunos mecanismos de control razonables. Aquí hay algunas similitudes con las normas que regulan las adquisiciones corporativas en el mundo de los negocios, donde se ha considerado prudente asegurarse de que a ninguna empresa individual se le permita dominar por completo el mercado. Estas prácticas de monopolio, si se permite que se produzcan de una manera no regulada, eliminarán por último toda competencia. No es bueno para la diversidad o la aptitud general.

En un sentido similar, con el fin de conservar la diversidad inmunitaria y la capacidad para responder rápidamente a los nuevos desafíos de naturaleza infecciosa, es necesario asegurar que no se les permita a las células T específicas para epítopos particulares proliferar en forma indefinida y, por último, dominar el compartimiento inmunitario. Inevitablemente, esto reduciría la probabilidad de que se pongan en marcha las respuestas frente a antígenos recién encontrados, ya que las células T vírgenes tendrían que competir por el acceso a las células dendríticas con cifras abrumadoras de las células T activadas previamente, con consecuencias desastrosas para la aptitud inmunitaria. Por estas razones, nuestros sistemas inmunitarios altamente adaptados han desarrollado formas de mantener una competencia sana entre las células T, que se logra a través de la regulación negativa de la respuesta inmunitaria tras la eliminación de un patógeno, junto con la destrucción selectiva de la mayoría de las células T que recientemente se habían expandido. Esto también es necesario porque el compartimiento inmunitario es de un tamaño relativamente limitado y no puede albergar un número infinito de linfocitos.

El control de las respuestas de células T se produce a través de varios mecanismos, algunos de los cuales operan a nivel de la célula T activa en sí, mientras que otros funcionan a través de otras subpoblaciones de células T (**células T reguladoras**) que utilizan una variedad de estrategias para frenar las respuestas de células T, algunas de las cuales están dirigidas a las células T, mientras que otras a las células dendríticas. Las células T reguladoras serán analizadas en detalle en el Capítulo 9, por lo que aquí nos centraremos sobre todo en las moléculas presentes en las células T activadas que actúan como "interruptores de apagado" de estas células T.

Las señales enviadas a través de CTLA-4 suprimen las respuestas de las células T

El **antígeno 4 del linfocito T citotóxico** (CTLA-4) está relacionado estructuralmente con el CD28 y también se une a los ligandos B7 (CD80/CD86). Sin embargo, en tanto que las interacciones CD28-B7 son coestimuladoras, las interacciones CTLA4-B7 actúan de manera opuesta y contribuyen a la terminación de la señalización TCR (Figura 8.10). CD28 se expresa en forma constitutiva sobre las células T, CTLA-4 no se encuentra sobre la célula en reposo, pero se sobreexpresa con rapidez en el transcurso de 3-4 horas después de la activación inducida por TCR/CD28. CTLA-4 tiene una afinidad 10 a 20 veces mayor tanto para B7.1 como para B7.2 y, por consiguiente, puede competir de modo favorable con CD28 para la unión con este último aun cuando esté presente en concentraciones relativamente

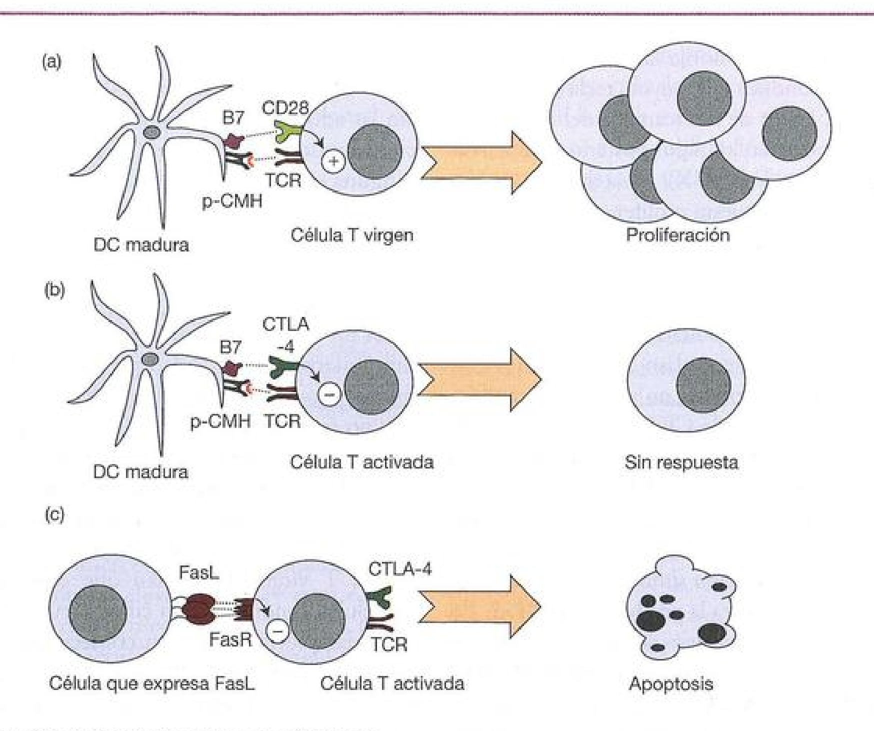


Figura 8.10. Disminución de las respuestas de células T.

a) La presentación del antígeno por una célula dendrítica (DC) madura proporciona estimulación antigénica eficaz por la vía del péptido-CMH (señal 1) y los ligandos B7 (señal 2) que ocupa el complejo del receptor T (TCR) y CD28 sobre la célula T, respectivamente. b) La presentación del antígeno a una célula T activada con anterioridad que expone CTLA-4 en su superficie (una molécula relacionada con CD28 que también puede interactuar con los ligandos B7) puede conducir a la falta de respuesta de la célula T debido a señales inhibidoras provistas a través de la coestimulación de CTLA-4 (véase el texto para más detalles). c) Mientras que las células T que poseen el receptor Fas en su superficie son de modo característico resistentes al ligamiento de este receptor, las células T activadas adquieren sensibilidad para la ocupación del receptor Fas (FasR) en el término de alrededor de una semana de la activación. La ocupación del FasR en las células susceptible produce la activación de la maquinaria de la muerte celular programada como consecuencia del reclutamiento y la activación de la caspasa-8 dentro del complejo FasR. La caspasa-8 activa propaga una cascada de otros acontecimientos de activación de caspasa para destruir la célula por el mecanismo de la apoptosis.

bajas. El mecanismo por el cual CTLA-4 suprime la activación de las células T ha sido objeto de intenso debate, ya que este receptor parece reclutar un repertorio similar de proteínas (como PI3K) en sus colas intracelulares como lo hace CD28. Sin embargo, se han propuesto varios mecanismos para explicar el efecto inhibidor de CTLA-4 en la activación de células T. Un mecanismo es por la simple competencia con CD28 para la unión de moléculas CD80/CD86 en la células dendríticas. Otro es a través del reclutamiento de las proteínas tirosinfosfatasas SHP-1 y SHP-2 en el complejo TCR que pueden contribuir a la terminación de las señales del TCR por proteínas desfosforilantes necesarias para la propagación de la señal de TCR. Asimismo, CTLA-4 puede antagonizar el reclutamiento del complejo TCR a las balsas de lípidos, que constituyen el sitio donde residen muchas de las proteínas de señalización que propagan las señales de TCR. Independientemente de su mecanismo de acción, sin dudas CTLA-4 es fundamental para mantener a las células T bajo control, y en este sentido, también es importante para evitar respuestas contra antígenos propios. Los ratones deficientes en CTLA-4 muestran un trastorno hiperproliferativo intenso y mueren en el transcurso de las 3 semanas de nacer debido a la infiltración tisular masiva y a la destrucción de órganos por las células T.

Las ligasas de ubicuitina de la familia Cbl moderan las señales de TCR

Se han identificado otras moléculas que pueden estar involucradas en regir la activación de las células T e incluyen la **familia c-Cbl** de proteínas. Los miembros de esta familia son **proteinligasas de ubicuitina** que pueden catalizar la degradación de las proteínas a través de la asociación de cadenas poliubicuitina a estas moléculas, que de ese modo las dirige a la destrucción a través de la vía del **ubicuitinproteasoma**. La cadena ξ del complejo del correceptor CD3 ha sido identificada como la diana de la ubicuitinización mediada por c-Cbl e y esto puede dar como resultado la internalización y la degradación del complejo TCR.

Por lo tanto, las proteínas c-Cbl puede elevar el umbral para las señales inducidas por el TCR a través de la desestabilización de este complejo. Los ratones doblemente deficientes en c-Cbl y Cbl-b (que parecen ejercer funciones algo redundantes) muestran hiperreactividad a las señales inducidas por TCR, lo que resulta en la proliferación excesiva y la producción de citocinas en las células T vírgenes, así como en las células T efectoras diferenciadas; como consecuencia, estos ratones mueren de enfermedades autoinmunitarias. Esto parece deberse a un defecto en la modulación negativa

del complejo TCR en las células T activadas. En tanto que los complejos TCR son normalmente internalizados y degradados después de la estimulación a través de los complejos péptido cognado-CMH (un acontecimiento que contribuye a las señales de terminación del TCR), los complejos TCR no son internalizados en las células deficientes Cbl/Cbl-b, lo que conduce a la señalización muy extendida de TCR y la expansión fuera de control de la célula T.

Las proteínas de la familia c-Cbl también pueden ejercer su influencia en la señalización de TCR de otras maneras y tener un papel especialmente importante en el mantenimiento de la exigencia de la coestimulación CD28 para la activación correcta de las células T. Es sorprendente que los ratones deficientes en Cbl-b pierden el requisito normal de la coestimulación CD28 (es decir, la señal 2) para la proliferación de las células T; estas células producen grandes cantidades de IL-2 y proliferan de modo vigoroso en respuesta a la estimulación de TCR sola. Esto implica que Cbl-b desempeña una función importante en el mantenimiento de la exigencia de la señal 2 para la activación de las células T vírgenes. A pesar de que todavía no está claro con exactitud cómo opera, la activación de Vav, que se produce en sentido anterógrado del TCR, así como la estimulación del receptor CD28, parece estar suprimida por Cbl-b en las células intactas. Por lo tanto, para la activación eficaz de Vav normalmente se requieren la señal 1 y la señal 2. Sin embargo, en ausencia de c-Cbl-b, una cantidad suficiente de activación de Vav se logra mediante la estimulación de TCR solo, lo que evita la necesidad de la coestimulación de CD28.

La muerte de las células T se producen a través de la estimulación de los receptores Fas de membrana

Otra forma importante de retirar a las células T de la función activa es destruirlas a través de la muerte celular programada (Figura 8.10). Las células T vírgenes, así como las células T recientemente activadas, expresan el receptor Fas (CD95) de membrana, pero no son sensibles a la estimulación a través de este receptor ya que estas células contienen un inhibidor endógeno (FLIP) de la molécula de señalización proximal, la caspasa-8, que es activada como resultado de la estimulación a través del receptor Fas. Sin embargo, tras varios ciclos de estimulación, las células T con experiencia se vuelven sensibles a la estimulación a través de sus receptores Fas, muy probablemente debido a la pérdida de la expresión de FLIP, y esta situación da lugar a la apoptosis de estas células. Los ratones deficientes en la expresión de FasR o de FasL manifiestan un síndrome linfoproliferativo que se traduce en enfermedades autoinmunitarias debido a la falta de muerte de los linfocitos recientemente expandidos.

Interacciones dinámicas en la sinapsis inmunitaria

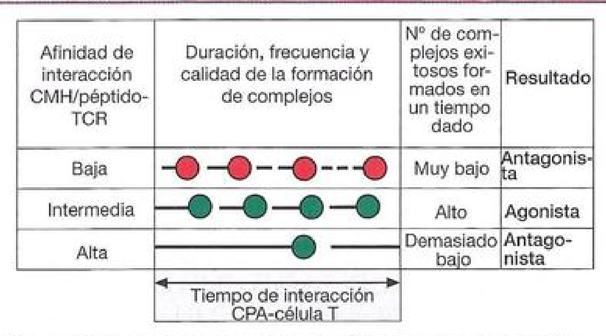
Como ya describimos, la activación exitosa del TCR implica un sinnúmero de acontecimientos de transducción de señales que culminan en la activación de las células T. Pero ¿cuál es la probabilidad de que ésta se produzca *in vivo*? Las células T deben ser altamente eficientes para encontrar su antígeno cognado y discriminar entre la activación y la no activación de complejos péptido-CMH por varias razones.

En primer lugar, las cantidades de células T que portan los TCR correctos para la ocupación productiva con péptido-CMH son, de modo característico, pequeñas; 1 de cada 100.000 células o menos puede responder a un péptido-CMH particular; la combinación no es inusual. Por consiguiente, las células T deben poder reconocer de modo eficaz la combinación correcta de péptido-CMH en un verdadero mar de moléculas de péptido propio-CMH y de péptido no activador-CMH. Debido a la necesidad de buscar la combinación correcta de péptido-CMH, **las células T vírgenes están en continuo movimiento dentro del ganglio linfático** y analizan a velocidades que les permiten ver hasta 5.000 células dendríticas en 1 hora; ¡muy similares a trabajadores de redes sociales (*networkers*)! Debido a esta velocidad feroz de movimiento, las interacciones de péptido-CMH son muy fugaces dado que las células se rozan entre sí a alta velocidad. Cuando se produce la interacción TCR activado-péptido-CMH, tan sólo 10 complejos péptido-CMH pueden persuadir a una célula T para que se detenga y permanezca largo rato, para formar una interacción más estable que conduce al ensamble productivo de la **sinapsis inmunitaria** (se describe a continuación). Por supuesto, el lector comprenderá que la célula T debe estar bastante segura de que es el complejo péptido-CMH correcto al que debe responder ya que si hay un error, las consecuencias son potencialmente desastrosas y pueden producir autoinmunidad.

El comportamiento de una célula T dentro de un ganglio linfático que busca la combinación correcta de péptido-CMH puede dividirse en varias fases. Mientras que el movimiento de la célula T es rápido durante la fase de búsqueda (fase I), el encuentro con el péptido agonista-CMH conduce a interacciones de la célula T-células dendríticas estables que duran alrededor de 12 horas (fase II), tiempo durante el cual se producen citocinas como IL-2. Esto es seguido por un retorno al movimiento rápido que implican más interacciones células dendríticas transitorias (fase III), durante la cual la célula T se divide varias veces y sale de los ganglios linfáticos.

Modelo de ocupación en serie del TCR para la activación de las células T

Ya hemos comentado que las principales fuerzas de anclaje que conjugan la CPA y su linfocito T equivalente deben provenir de moléculas accesorias complementarias, como ICAM-1/LFA-1 y LFA-3/CD2, y no a través de los enlaces TCR-CMH más péptido, de afinidad relativamente baja (Figura 8.3). No obstante, el reconocimiento del antígeno cognado por el TCR sigue siendo una condición *sine qua non* para la activación de las células T. Pero ¿cómo pueden sólo 10 complejos CMH-péptido en una células dendríticas, a través de la formación de complejos de baja afinidad con el TCR, ejecutar la tarea hercúlea de mantener un flujo intracelular elevado de calcio durante los 60 minutos necesarios para la activación celular completa? Cualquier disminución del flujo de calcio, como podría ser la ocasionada por el agregado de un anticuerpo al CMH, hace que, de



Afinidad de interacción CMH/péptido-TCR	Duración, frecuencia y calidad de la formación de complejos	Nº de complejos exitosos formados en un tiempo dado	Resultado
Baja		Muy bajo	Antagonista
Intermedia		Alto	Agonista
Alta		Demasiado bajo	Antagonista
	Tiempo de interacción CPA-célula T		

Figura 8.11. Modelo de estimulación en serie de la activación del TCR (Valitutti S. y Lanzavecchia A. [1995], *The Immunologist* **3**, 122). Los complejos de afinidad intermedia entre CMH-péptido y TCR sobreviven el tiempo suficiente como para que el TCR realice la transducción de una señal de activación efectiva y el complejo CMH-péptido se disocie y ocupe de manera fructífera otro TCR. Es necesaria una tasa elevada y sostenida de formación de complejos productivos para la activación completa de las células T. Los complejos de baja afinidad tienen una semivida corta y no ejercen ningún efecto sobre el TCR o producen la inactivación, tal vez mediante una fosforilación parcial de las cadenas ●, con la activación exitosa del TCR; ●, inactivación de TCR; –, sin efecto: la longitud de la barra horizontal indica la duración de la vida de ese complejo). Como son de baja afinidad, se reciclan rápido y ocupan e inactivan gran cantidad de TCR. Los complejos de alta afinidad tienen una semivida tan prolongada antes de la disociación que hay una cantidad insuficiente de acontecimientos activadores efectivos. Por lo tanto, los ligandos peptídicos modificados de baja o de alta afinidad pueden actuar como antagonistas al impedir el acceso de los agonistas a una cantidad suficiente de TCR vacantes. Algunos péptidos modificados actúan como agonistas parciales ya que producen efectos diferenciales en los resultados de la activación de células T. Por ejemplo, un único cambio de residuo en un péptido hemoglobina redujo 10 veces la secreción de IL-4, pero inactivó por completo la proliferación de células T. El mecanismo abarca presumiblemente procesos de fosforilación incompletos y con traducción insuficiente que tienen lugar a través de una semivida truncada de ocupación del TCR, efectos alostéricos sobre las parejas CMH-TCR o una alineación errónea en la orientación del péptido dentro del complejo. (Reproducido con autorización de Hogrefe y Huber Publishers.)

manera obediente, el NFAT$_C$ regrese desde el núcleo a su localización citoplasmática, lo cual aborta el proceso de activación.

En un hallazgo sorprendente, Salvatore Valitutti y Antonio Lazavecchia han demostrado que únicamente 100 complejos CMH-péptido en una CPA pueden regular negativamente 18.000 TCR en su par, el linfocito T cognado. Estos autores sugieren que cada complejo CMH-péptido puede ocupar *en forma seriada* hasta 200 TCR. En su modelo, la conjugación de un dímero CMH-péptido con dos TCR activa la transducción de señales, la fosforilación de las cadenas ξ asociadas al CD3 con los acontecimientos en cadena ulteriores y la regulación negativa de esos TCR. La unión de afinidad intermedia favorece la disociación del CMH-péptido, al que libera para ocupar y activar otro TCR y mantener de ese modo los procesos de activación intracelulares necesarios. El modelo de acción **agonista** también explicaría por qué los péptidos con interacciones de afinidad más bajas o más altas que lo óptimo

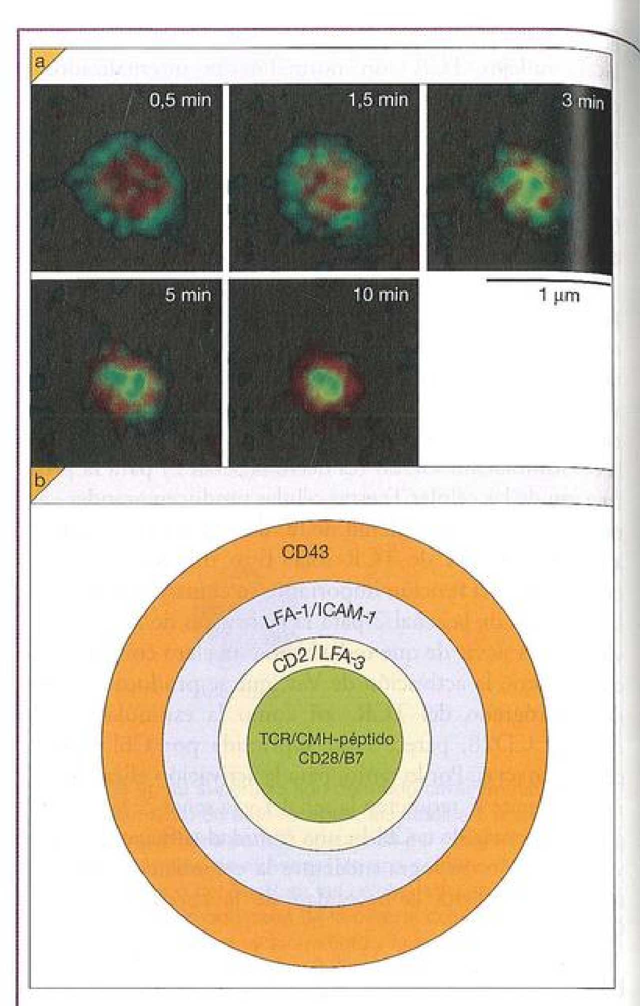


Figura 8.12. Sinapsis inmunitaria.

a) Formación de la sinapsis inmunitaria. Las células T entraron en contacto con bicapas lipídicas planares; se muestran las posiciones del CMH-péptido ocupado *(verde)* e ICAM-1 ocupado *(rojo)* en los tiempos indicados después del contacto inicial. (Reproducido con autorización de Grakoui A, Dustin ML, y col. [1999], *Science* **285**, 221. © American Association for the Advancement of Science.); b) Representación esquemática de la sinapsis resuelta en la cual los pares de moléculas de adhesión CD2 /LFA-3 y LFA-1 / ICAM-1, que en un comienzo estaban en el centro, se han trasladado hacia el exterior y ahora circundan el reconocimiento del antígeno y la interacción de señalización entre TCR y CMH-péptido, así como la interacción coestimuladora entre CD28 y B7. Se ha señalado que la molécula CD43 se une a ICAM-1 y E-selectina, y que después de la unión es capaz de inducir la expresión de mRNA de IL-2, CD69 y CD154 (CD40L), y de activar la unión de los factores de transcripción AP-1, NFκB y NFAT.

podrían comportarse como **antagonistas** (Figura 8.11). El importante fenómeno de los péptidos modificados que se comportan como **agonistas parciales**, con efectos diferentes sobre el resultado de la activación de las células T, se expone en el epígrafe de la Figura 8.11.

La sinapsis inmunitaria

Algunos experimentos en los que se utilizaron moléculas de péptido-CMH e ICAM-1, marcadas con diferentes fluo-

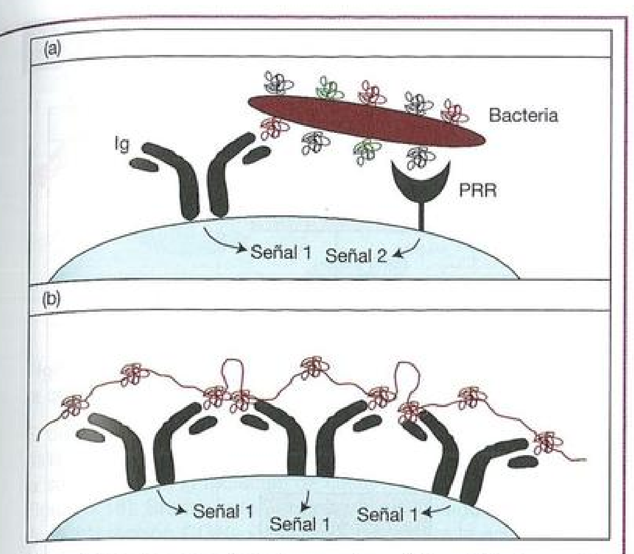


Figura 8.13. Reconocimiento por las células B de los antígenos timoindependientes: (a) de tipo 1 y (b) de tipo 2.

El complejo envía una señal sostenida a la célula B a causa de la semivida prolongada de este tipo de molécula.

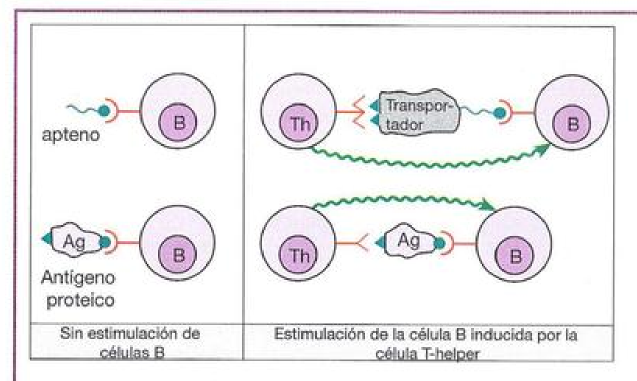


Figura 8.14. Las células T *helper* cooperan, a través de determinantes de proteínas transportadoras, para ayudar a que las células B respondan al hapteno o a determinantes equivalentes sobre los antígenos (Ag) mediante la producción de señales accesorias.

(Para simplificar, se han ignorado el componente del CMH y el procesamiento del epítopo en el reconocimiento de las células T, pero no deben olvidarse.)

rocromos e insertadas en una bicapa lipídica planar sobre un soporte de vidrio, proporcionaron pruebas a favor de la idea de que la activación de las células T se produce en el contexto de una sinapsis inmunitaria. Estos y otros estudios por imágenes revelaron que la sinapsis inmunitaria entre la célula T y la células dendríticas tiene un patrón en "tiro al blanco" con un grupo central de TCR-péptido-CMH, conocido como **cSMAC** (*central supramolecular activation complex*; **complejo de activación supramolecular central**), rodeado por un anillo de la integrina LFA-1 que interactúa con su ligando cognado ICAM-1 en la células dendríticas (Figura 8.12). Las interacciones TCR-CMH, inicialmente inestables, se producen fuera del anillo de integrina, seguido por el desplazamiento de las moléculas péptido-CMH en el cSMAC, que cambian de lugar con las moléculas de adhesión que forman ahora el anillo externo (Figura 8.12). Se ha sugerido que la generación de la sinapsis inmunitaria sólo se produce después de que se ha logrado un cierto nivel de umbral inicial de activación del TCR y que su formación depende de la reorganización del citoesqueleto y conduce a la potenciación de la señal. La ocupación de LFA-1 con ICAM-1 es esencial para la formación de sinapsis inmunitarias por varias razones. En las primeras etapas de formación de sinapsis, estas moléculas actúan con una capacidad predominantemente adhesiva para adherir a las células opuestas a fin de facilitar las interacciones del YCR y el péptido-CMH, lo que permite que las células T analicen el complejo péptido-CMH que se les ofrece.

Las células B responden a tres tipos diferentes de antígenos

Normalmente, las células B requieren de las células T para generar anticuerpos de alta afinidad y sufrir un cambio de clase. Sin embargo, como describiremos a continuación, ciertos tipos de antígenos (denominados antígenos timoindependientes) pueden promover la activación de células B sin la colaboración de las células T. Los anticuerpos así formados suelen ser de baja afinidad y no sufren cambio de clase ni hipermutación somática, pero proporcionan protección rápida frente a ciertos microorganismos y ganan tiempo para que se formen las respuestas de células B que dependen de las células T.

1. Antígenos timoindependientes de tipo 1

Ciertos antígenos, como los lipopolisacáridos bacterianos, en una concentración suficientemente elevada, tienen la capacidad de activar en forma policlonal una proporción importante de la dotación de células B, es decir, sin referencia a la especificidad de antígeno de las regiones hipervariables del receptor de superficie. Esto se produce mediante la unión a moléculas de superficie, como los receptores de tipo Toll (TLR) descritos en el Capítulo 1, que eluden la primera parte de la vía bioquímica mediada por el receptor específico para el antígeno. En concentraciones que son demasiado bajas como para producir activación policlonal a través de la unión sin ayuda a estas moléculas de derivación mitogénica, la población de células B con receptores específicos de Ig para estos antígenos los enfocan de manera selectiva y pasiva sobre su superficie, donde la alta concentración local resultante bastará para impulsar el proceso de activación (Figura 8.13a).

2. Antígenos timoindependientes de tipo 2

Ciertos antígenos lineales, que no son degradados con facilidad en el organismo y que tienen un determinante muy repetido y apropiadamente espaciado –por ejemplo, polisacárido de *Pneumococcus*, Ficoll, polímeros de D-aminoácidos y polivinilpirrolidona– también son timoindependientes en su capacidad para estimular las células B en forma directa, sin necesidad de que participen las células T.

Avances y descubrimientos 8-1—Colaboración T-B para la producción de anticuerpos

En la década de 1960, a medida que se develaban lentamente los misterios del timo, nuestros colegas de entonces, haciendo retroceder las fronteras del conocimiento, descubrieron que la timectomía neonatal en el ratón no sólo abolía el rechazo celular de los injertos cutáneos, sino también la respuesta de anticuerpos a algunos de los antígenos, aunque no a todos (Figura A8.1.1). Las investigaciones ulteriores demostraron que se necesitaban tanto los timocitos como las células de la médula ósea para las respuestas óptimas de anticuerpos contra esos **antígenos timodependientes** (Figura A8.1.2). Al llevar a cabo esas transferencias con células de animales que tenían un marcador cromosómico reconocible (T6), se hizo evidente que las células formadoras de anticuerpos derivaban del inóculo de médula ósea; de ahí las siglas "T" para los linfocitos derivados del *T*imo y "B" para los precursores de las células formadoras de anticuerpos que se originaban en la médula ósea ("*B*one marrow"). Esta conveniente nomenclatura se ha afianzado aun sabiendo que la médula ósea contiene precursores embrionarios de las células T, ya que las células T y B inmunocompetentes se diferencian en el timo y la médula ósea, respectivamente (véase el Capítulo 11).

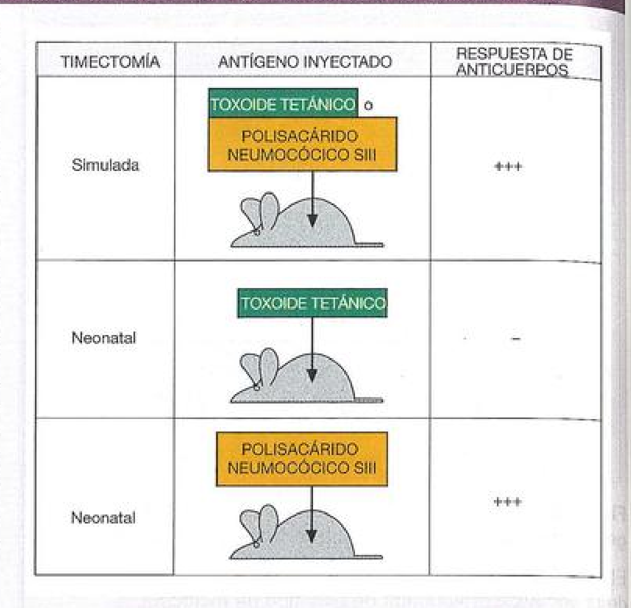


Figura A8.1.1. La respuesta de anticuerpos es timodependiente contra algunos antígenos, y timoindependiente contra otros.

La respuesta al toxoide tetánico en los animales con timectomía neonatal podría ser restablecida con la inyección de timocitos.

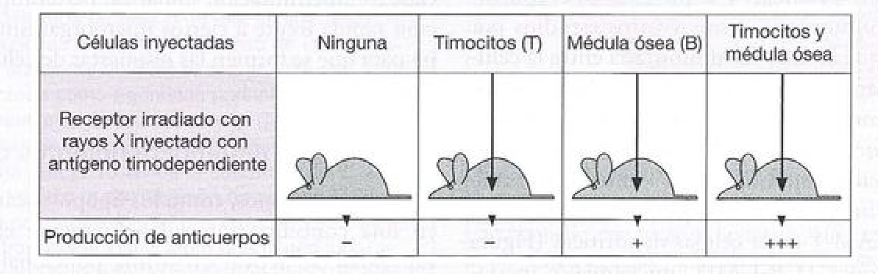


Figura A8.1.2. La respuesta de anticuerpos contra un antígeno timodependiente requiere dos poblaciones celulares distintas.

Se inyectaron diferentes poblaciones de células de un ratón normal histocompatible con el receptor (es decir, el mismo haplotipo H-2) en receptores que habían sido irradiados con rayos X para destruir sus propias respuestas de linfocitos. Después se estimularon con un antígeno timodependiente, como eritrocitos de carnero (es decir, un antígeno que no da una respuesta en los ratones con timectomía neonatal; Figura A8.1.1), y se examinó la producción de anticuerpos al cabo de 2 semanas. La pequeña cantidad de anticuerpos sintetizados por los animales que recibieron médula ósea sola se debe a la presencia de precursores timocíticos en el inóculo celular que se diferencian en el timo indemne del receptor.

Persisten durante períodos prolongados sobre la superficie de macrófagos especializados que se localizan en el seno subcapsular de los ganglios linfáticos y la zona marginal esplénica, y pueden unirse a células B específicas para el antígeno con gran avidez a través de su fijación multivalente a los receptores complementarios de Ig, con los cuales forman entrecruzamientos (Figura 8.13b).

En general, los antígenos timoindependientes dan origen sobre todo a respuestas de IgM de baja afinidad, algo de IgG3 en el ratón y relativamente poca o ninguna memoria. Las células B neonatales no responden bien a los antígenos de tipo 2 y esto tiene consecuencias importantes para la eficacia de las vacunas con hidratos de carbono en los niños pequeños.

3. Antígenos timodependientes

La necesidad de colaboración con las células T helper

Muchos antígenos son timodependientes, ya que provocan escasa o ninguna respuesta de anticuerpos en los animales que han sido timectomizados al nacer y que tienen pocas células T (Avances y descubrimientos 8-1). Estos antígenos no pueden satisfacer los requerimientos moleculares para la estimulación directa; pueden ser univalentes con respecto a la especificidad de cada determinante, ser degradados con facilidad por las células fagocíticas y carecer de mitogenicidad. Si se unen a los receptores de las células B, se sitúan sobre la superficie, al igual que un hapteno, y no activan la

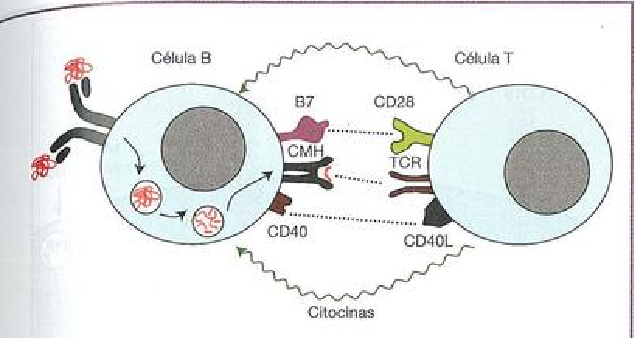


Figura 8.15. Manejo de un antígeno timodependiente por la célula B y presentación a una célula T activada.

El antígeno capturado por el receptor Ig de superficie es internalizado dentro de un endosoma, procesado y expresado en la superficie con la molécula de clase II del CMH (véase la Figura 5.16). Se necesitan señales coestimuladoras a través de la interacción CD40- CD40L (CD154) para la activación de la célula en reposo por la célula T *helper*. Además de la coestimulación basada en CD40L, las células T *helper* también proporcionan estimulación adicional a la célula B en la forma de citocinas, como IL-4.

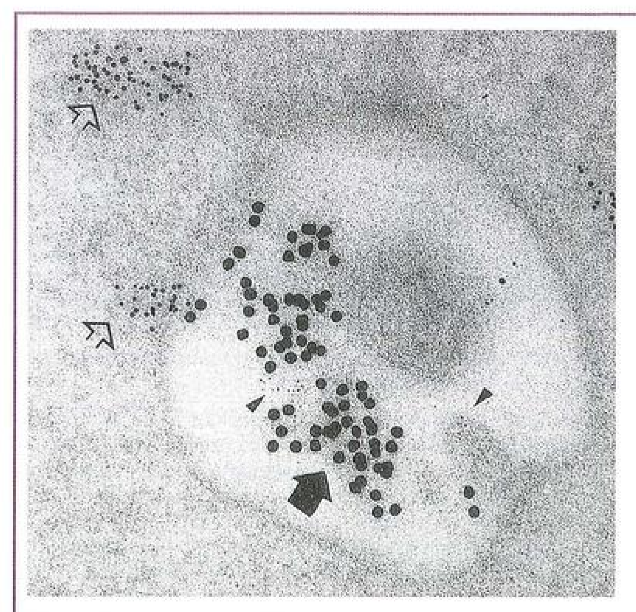


Figura 8.16. Demostración de que los receptores Ig de superficie de las células B endocitados ingresan en las vesículas citoplasmáticas preparadas para el procesamiento de los antígenos.

La IgG de superficie fue unida en forma cruzada con la Ig de cabra antihumana, y la IgG de conejo anticabra conjugada, con partículas de oro de 15 nm *(flecha grande negra).* Después de 2 minutos, se prepararon cortes celulares y se tiñeron con cadena invariable anti-HLA-DR (oro 2 nm; *puntas de flecha*) y un anticuerpo contra una proteasa catepsina (oro 5 nm; *puntas de flecha claras*). Así, la IgG internalizada es expuesta a la proteólisis en una vesícula que contiene moléculas de clase II. La presencia de cadena invariable muestra que las moléculas de clase II derivan del retículo endoplasmático y del Golgi, no de la superficie celular. Obsérvese el uso inteligente de las partículas de oro de diferentes tamaños para distinguir los anticuerpos utilizados en la localización de distintas proteínas intravesiculares, etc. (Fotografía reproducida con autorización de los autores y los editores de Guagliardi LE y col. [1990], *Nature* **343**, 133. Copyright © 1990 Macmillan Magazines Ltd.)

célula B (Figura 8.14). Repasemos la definición de un hapteno: es una molécula pequeña similar al dinitrofenilo (DNP) que se une a anticuerpos preformados (p. ej., el receptor de superficie de una célula B específica), pero que no estimula la producción de anticuerpos (es decir, no estimula la célula B). Recuérdese también que los haptenos se tornan inmunógenos cuando se acoplan a una proteína transportadora apropiada. Sobre la base del conocimiento de que tanto las células B como las células T son necesarias para las respuestas de anticuerpos contra antígenos timodependientes (Avances y descubrimientos 8.1), sabemos ahora que la función del transportador es estimular las células T helper que cooperan con las células B para permitirles que respondan al hapteno proporcionando señales accesorias (Figura 8.14), También debe ser evidente, a partir de la Figura 8.14, que, mientras un determinante sobre un antígeno proteico típico se está comportando como un hapteno en la unión con la célula B, los otros determinantes cumplen una función transportadora con el reclutamiento de las células T *helper.*

Procesamiento del antígeno por las células B

La necesidad de **ligamiento físico del hapteno y el transportador** sugiere con firmeza que las células T *helper* deben reconocer los determinantes del transportador sobre la célula B que responde para proporcionar las señales estimuladoras accesorias relevantes. Sin embargo, dado que las células T sólo reconocen el antígeno procesado ligado a la membrana y asociado con las moléculas del CMH, las células T *helper* no pueden reconocer el antígeno nativo ligado simplemente a los receptores de Ig de la célula B, como se muestra en la Figura 8.14. Sin embargo, no todo está perdido, puesto que **las células B cebadas pueden presentar el antígeno a las células T helper** y funcionan en realidad con concentraciones de antígeno mucho más bajas que las células presentadoras convencionales porque pueden focalizar el antígeno a través de sus receptores de superficie. El antígeno ligado a la IgG de superficie es internalizado en los endosomas, que luego se fusionan con vesículas que contienen moléculas de clase II del CMH con su cadena invariable. El procesamiento del antígeno proteico puede producirse entonces como se describe en el Capítulo 5 (véase la Figura 5.16) y el péptido antigénico resultante es reciclado hacia la superficie en asociación con las moléculas de clase II, donde está disponible para ser reconocido por las células T *helper* específicas (Figuras 8.15 y 8.16). Por lo tanto, se pone de manifiesto la necesidad de la unión física entre el hapteno y el transportador; el hapteno conduce al transportador que va a ser procesado dentro de la célula que está programada para elaborar anticuerpos antihapteno, y después del estímulo por la célula T *helper* que reconoce el transportador procesado, lleva a cabo su programa y finalmente produce anticuerpos que reaccionan con el hapteno (¿no hay límite para las determinaciones de la naturaleza?).

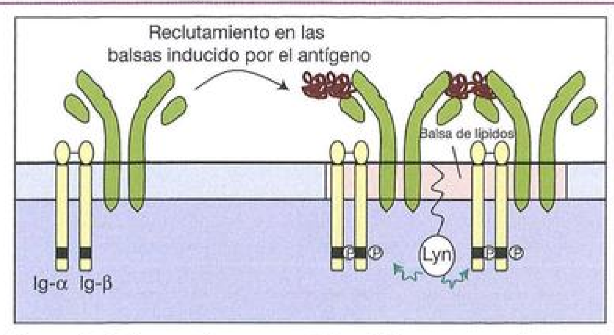


Figura 8.17. Los enlaces cruzados del receptor reclutan el BCR en las "balsas" *(rafts)* lipídicas.

Los entrecruzamientos del receptor inducidos por el antígeno reclutan al BCR –que normalmente está excluido de los dominios de la balsa de lípidos de la membrana con alto contenido en colesterol– en las balsas de la membrana donde residen las proteínas de señalización, como la proteína tirosincinasa Lyn. El reclutamiento estable del BCR en las balsas facilita la fosforilación de ITAM mediado por Lyn dentro de las colas citoplasmáticas de las moléculas accesorias Ig-α e Ig-β que inician la cascada de señalización dirigida por BCR.

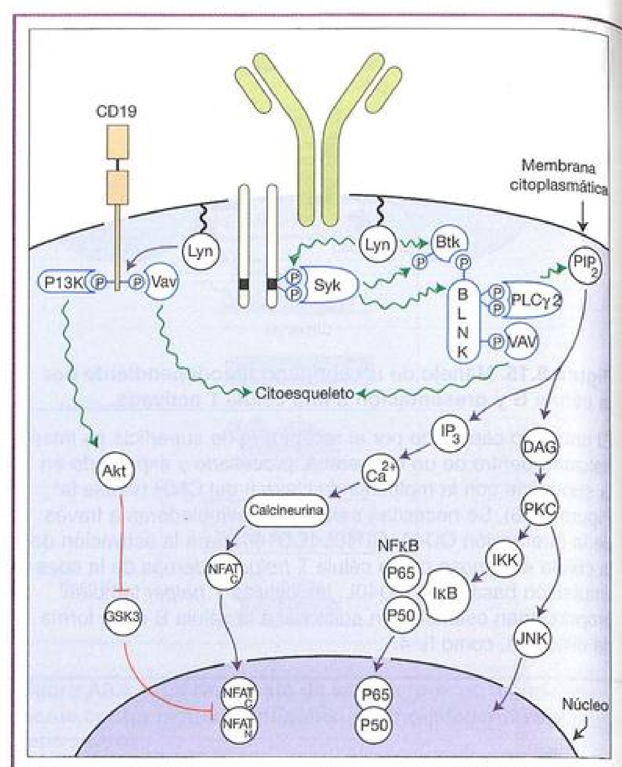


Figura 8.18. Flujo de la cascada de señalización de la ligación del receptor de la célula B dirigida por el antígeno.

En la interacción con el antígeno, el BCR es reclutado en las balsas de lípidos donde los ITAM dentro del heterodímero Ig-α/β sufren fosforilación por Lyn. Esto es seguido del reclutamiento y la activación de las cinasas Syk y Btk. La fosforilación de la proteína adaptadora de la célula B, BLNK, crea los sitios de unión para otras proteínas, como PLCγ2, que promueve la hidrólisis de PIP_2 y provoca una cadena de acontecimientos de señalización que culmina en la activación de los factores de transcripción NFAT y NFκB. La molécula correceptora CD19 también es fosforilada por Lyn y puede suprimir los efectos inhibitorios de GSK3 en NFAT a través de la vía de P13K/Akt. La estimulación de BCR también produce el reordenamiento del citoesqueleto celular por medio de la activación de Vav, que actúa como un factor de intercambio del nucleótido guanina para las proteínas G pequeñas como Rac y Rho.

La naturaleza de la activación de las células B

Al igual que las células T, las células B vírgenes o en reposo no están en división, y la activación a través del receptor de la célula B (BCR) las conduce al ciclo celular. Como en el caso del receptor de la célula T, el receptor de la célula B (Ig de superficie) carece de actividad enzimática intrínseca. Una vez más, las moléculas accesorias asociadas con el receptor del antígeno propagan las señales de activación en la célula B. Se mencionó en el Capítulo 4 que el complejo BCR está compuesto por inmunoglobulina anclada en la membrana, que se asocia con un heterodímero Igαe Igβ unidas por un enlace disulfuro, cuyas colas citoplasmáticas contienen un solo motivo de ITAM (Figura 4.4). Como veremos a continuación con mayor detalle, los entrecruzamientos del BCR que dirigen el antígeno dan lugar a la iniciación de una cascada de señalización dirigida por PTK, sembrada por los ITAM Igα/β que despierta una variedad de factores de transcripción de su letargo celular.

Las células B son estimuladas por entrecruzamientos de la inmunoglobulina de superficie

La activación de la célula B comienza con la interacción entre el antígeno y la inmunoglobulina de superficie. Se piensa que el reclutamiento del BCR en las balsas de lípidos desempeña una función importante en la activación de la célula B, ya que la Ig de superficie normalmente está excluida de aquéllas, pero es reclutada con rapidez en las balsas en el curso de algunos minutos después de la formación de los entrecruzamientos de Ig (Figura 8.17); este proceso sirve para llevar la PTK **Lyn** en íntima proximidad con los ITAM dentro de las colas citoplasmáticas del heterodímero Igα/β asociado con el BCR, ya que Lyn está asociada constitutivamente con las balsas de lípidos. Tras el reclutamiento, Lyn agrega grupos fosfato a los residuos de tirosina dentro de los motivos ITAM de las colas citoplasmáticas del complejo Igα/β. Enseguida se produce la unión de PTK **Syk** a los ITAM junto con otra cinasa, **Btk (tirosincinasa de Bruton)**. En su actividad, Lyn también fosforila los residuos dentro de la molécula correceptora CD19, un componente del complejo del correceptor de la célula B (descrito en detalle en la sección siguiente) que refuerza las señales iniciadas por el BCR (Figura 8.18).

Syk cumple una función crítica dentro del proceso de activación de la célula B; la ruptura del gen que codifica Syk en el ratón tiene efectos profundos en los acontecimientos del flujo de señalización de la célula B y produce el desarrollo de células B defectuosas. En este aspecto, Syk cumple una función similar en las células B a la que tiene ZAP-70

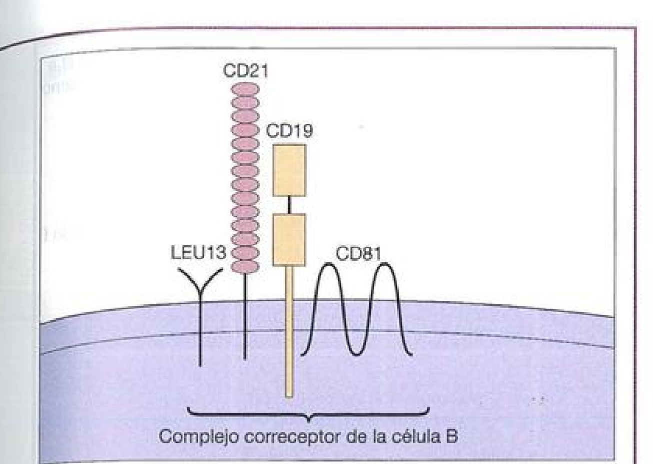


Figura 8.19. Complejo correceptor del BCR.

El complejo correceptor de la célula B proporciona señales coestimuladoras para la activación de la célula B a través del reclutamiento de varias moléculas de señalización, como fosfatidilinositol 3-cinasa y Vav, que pueden amplificar las señales iniciadas a través del receptor de la célula B. En las células B maduras, CD19 forma un complejo tetramérico con otras tres proteínas: CD21 (receptor del complemento de tipo 2), CD81 (TAPA-1) y CD225 (proteína 1 transmembrana inducida por interferón; LEU13). Véase también la Figura 4.6.

en las células T. En estado activo, SyK fosforila y recluta **BLNK** (conector de células B; también conocido como SLP65, BASH y BCA) al complejo BCR. En la fosforilación por Syk, BLNK proporciona los sitios de unión para la **fosfolipasa Cγ2** (PLCγ2), Btk y **Vav**. El reclutamiento de Btk en íntima proximidad con PLCγ2 permite la fosforilación de Btk y aumenta su actividad. Como sucede en la vía de señalización de la célula T, la PLCγ2 activada inicia una vía que involucra la hidrólisis de PIP_2 para generar diacilglicerol y trifosfato de inositol, y lleva a un aumento del calcio intracelular y a la activación de PKC (figura 8.18). A su vez, ésta causa la activación de los factores de transcripción **NFκB** y **JNK**, y el aumento del calcio intracelular produce la activación de **NFAT**, así como lo hace en las células T.

La familia Vav de factores de intercambio del nucleótido guanina consiste al menos en tres isoformas (Vav-1, Vav-2 y Vav-3) y se sabe que estos factores desempeñan una función crucial en la señalización de la célula B a través de la activación de Rac1 y la regulación de cambios del citoesqueleto después de la formación de entrecruzamientos del BCR; las células B deficientes en Vav-1 son defectuosas en la proliferación asociada con los entrecruzamientos del BCR (Figura 8.18).

El modelo de entrecruzamiento del BCR parece apropiado para una comprensión de la estimulación por los antígenos timoindependientes de tipo 2, dado que sus determinantes repetitivos aseguran una unión fuerte y entrecruzamientos con múltiples receptores de Ig sobre la superficie de la célula B para formar agregados que persisten debido a la semivida prolongada del antígeno y mantienen el elevado nivel de calcio intracelular necesario para la activación. Es probable, por otra parte, que los antígenos timoindependientes de tipo 1, al igual que los activadores policlonales de las células T, pasen por alto el receptor específico y actúen directamente sobre las moléculas como el diacilglicerol y la proteincinasa C, por cuanto Igαe Ig-β no son fosforiladas.

Las células B requieren la coestimulación por medio del complejo del correceptor de la célula B para lograr una activación eficaz

De modo similar a lo que sucede con las células T, las células B también precisan **dos formas de coestimulación** para montar respuestas efectoras eficaces.

Una forma de coestimulación tiene lugar en el punto de encuentro inicial del BCR con su antígeno cognado y es proporcionada por el **complejo correceptor de la célula B**, que puede ser ocupado con moléculas, como las del complemento, que pueden estar presentes en estrecha proximidad al antígeno específico reconocido por el BCR. La otra forma de coestimulación requerida por las células B se produce después del encuentro inicial con el antígeno y es provista por las células T en la forma de **ligando CD40 asociado con la membrana que se ocupa con el CD40** ubicado sobre la célula B. Esta forma de coestimulación necesita que la célula B tenga el antígeno internalizado, seguido por el procesamiento y la presentación por moléculas de clase II del CMH a una célula T apropiada. Si la célula B expone una combinación CHM-péptido reconocida por una célula T, esta última será estimulada para producir citocinas (como IL-4) así como para proporcionar coestimulación a la célula B en la forma de CD40L. Consideraremos aquí la naturaleza de las señales coestimuladoras proporcionadas por el complejo correceptor de células B y trataremos la coestimulación basada en el CD40L en una sección posterior.

El complejo correceptor de la célula B madura (Figura 8.19) se compone de cuatro componentes: CD19, CD21 (receptor del complemento de tipo 2, CR2), CD81 (TAPA-1) y CD225 (LEU13; proteína 1 de transmembrana inducida por interferón). CR2 es un receptor para el producto de degradación C3d del complemento, y su presencia dentro del complejo correceptor del BCR permite que un componente de la respuesta inmunitaria innata (el complemento) actúe en forma sinérgica con el BCR para activar de manera productiva las células B. Imaginemos una bacteria que ha activado el complemento y se ha recubierto con los productos de su activación, incluso C3d. Si la misma bacteria es capturada con posterioridad por el BCR de una célula B, existe ahora la oportunidad para que el CR2 dentro del complejo correceptor de BCR se una a C3d, lo que significa que la célula B recibe ahora dos señales simultáneas. La señal uno proviene del BCR y la señal dos, del complejo correceptor. Así que ¿cómo hace la ocupación simultánea del complejo correceptor y el BCR para mejorar la activación de las células B?

Así, la respuesta es que no se conoce con certeza, pero está claro que CD19 desempeña una función especialmente importante en este proceso. **CD19** es una proteína de transmembrana específica de la célula B que se expresa desde la etapa de célula pro-B a la de plasmocito y tiene una cola citoplasmática relativamente larga que contiene nueve residuos de tirosina. Tras la estimulación del receptor de la célula B, la cola citoplasmática de CD19 sufre la fosforilación en varios de estos residuos de tirosina (por cinasas asociadas con el BCR)

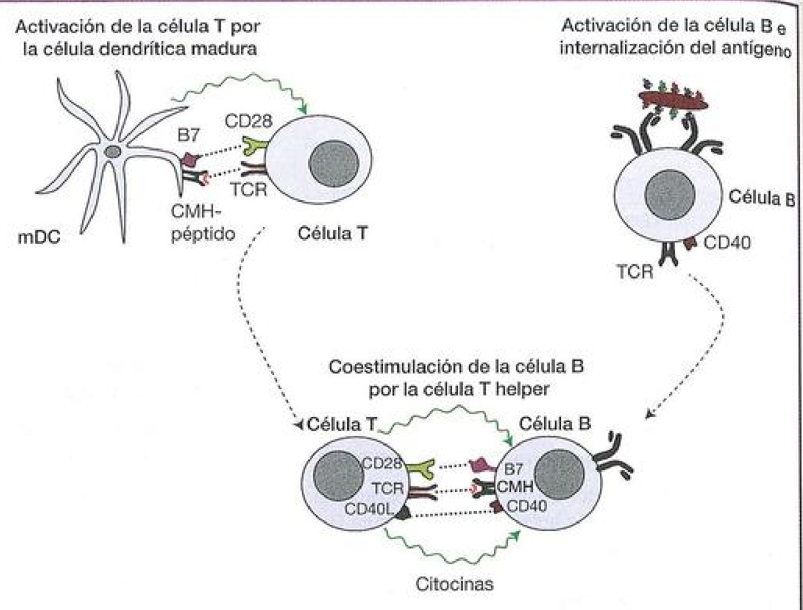


Figura 8.20. Coestimulación de la célula B dependiente de CD40-CD40L por una célula T *helper*.
Las células B y T activadas independientemente pueden interactuar si la célula B está presentando el complejo péptido-CMH suficiente para la estimulación de la célula T. La presentación exitosa del antígeno por una célula B a una célula T *helper* activada produce la coestimulación dependiente de CD40L de la célula B así como la provisión de citocinas, como IL-4, por la célula T que son esenciales para el cambio de clase, la expansión clonal y la diferenciación a células efectoras.

que crea sitios de unión en CD19 para varias proteínas, como la tirosincinasa Lyn y la fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3K). CD19 desempeña cierta función como plataforma para el reclutamiento de varias proteínas en el complejo BCR (Figura 8.18), muy similar a las funciones que desempeña LAL en la activación del receptor de las células T.

Vav también es reclutado en la molécula correceptora CD19 tras la fosforilación por Lyn, y junto con PI3K, que también se une a CD19 como resultado de la fosforilación mediada por Lyn (Figura 8.18), desempeñan su función en la activación de la cinasa serina/treonina **Akt**; ésta también puede reforzar la activación de NFAT a través de la neutralización de los efectos inhibitorios de **GSK3 (cinasa glucógeno sintasa 3)** sobre NFAT. Como GSK3 puede asimismo fosforilar y desestabilizar a Myc y ciclina D, que son esenciales para la entrada en el ciclo celular, la activación de Akt tiene efectos positivos en la proliferación de la célula B activada.

Lo mismo que CD28 en las células T, el correceptor de las células B tiene la función de amplificar alrededor de 100 veces las señales transmitidas a través del BCR. Como mencionamos antes, dado que las moléculas CD19 y CR2 (CD21) se benefician de la asociación mutua, esto podría ser provocado por la formación de puentes de receptores Ig y CR2 en la superficie de la célula B mediante complejos antígeno-C3d unidos a la superficie de las CPA. Así, la agrupación inducida por el antígeno del complejo correceptor de la célula B con el BCR disminuye el umbral para la activación de la célula B; esto se produce cuando las cinasas asociadas con el BCR entran en proximidad estrecha con el complejo correceptor. La acción de estas cinasas en el complejo correceptor emplea vías de señalización que refuerzan las señales originadas en el BCR.

Las células B también requieren la coestimulación de las células T *helper*

Al igual que las células T necesitan señales coestimuladoras de las células dendríticas en forma de ligandos B7 para la activación productiva (Figura 8.3), las células B dependientes de T requieren también la coestimulación de los linfocitos T para cruzar el umbral necesario para la expansión clonal y la diferenciación a células efectoras (Figura 8.15). La secuencia de acontecimientos es muy similar. Tras el encuentro con el antígeno cognado mediante la unión directa con un microorganismo, el BCR sufre procesos de activación inicial como los descritos antes. Esto culmina en la internalización del BCR, junto con el antígeno capturado, que entonces es procesado y presentado sobre moléculas de clase II del CMH (Figura 8.20). Para continuar con el proceso de maduración hacia un plasmocito o una célula de memoria, las células B ahora deben encontrar una célula T capaz de reconocer a uno de los péptidos antigénicos que le presenta la célula B desde que el antígeno ha sido internalizado. Obsérvese que no necesariamente debe ser el mismo epítopo reconocido por la célula B para sufrir la activación inicial. Al encontrarse con una célula T con el TCR apropiado, la célula B proporciona la estimulación a la célula T en la forma de CMH-péptido, así como señales de coestimulación B7 (Figura 8.20). A su vez, la células T sobreexpresa el ligando CD40 (CD40L) que puede proporcionar coestimulación esencial a la célula B, lo que permite que esta última sea totalmente activada y sufra expansión clonal y cambio de clase. Si falla la ayuda de CD40L, las células B rápidamente sufren un proceso de apoptosis y son eliminadas. Así, las células B y las células T proporcionan coestimulación mutua como un medio de reforzar sus señales de activación iniciales (Figura 8.20).

En realidad, el linfocito B está actuando como una célula presentadora de antígeno y, como se mencionó antes, es muy eficiente a causa de su capacidad para concentrar el antígeno focalizándolo sobre su Ig de superficie. No obstante, aunque una célula T *helper* activada puede interactuar con una célula B en reposo y estimularla, una célula T *en reposo* sólo puede ser activada por una célula B que ha adquirido el coestimulador B7, y éste sólo se halla presen-

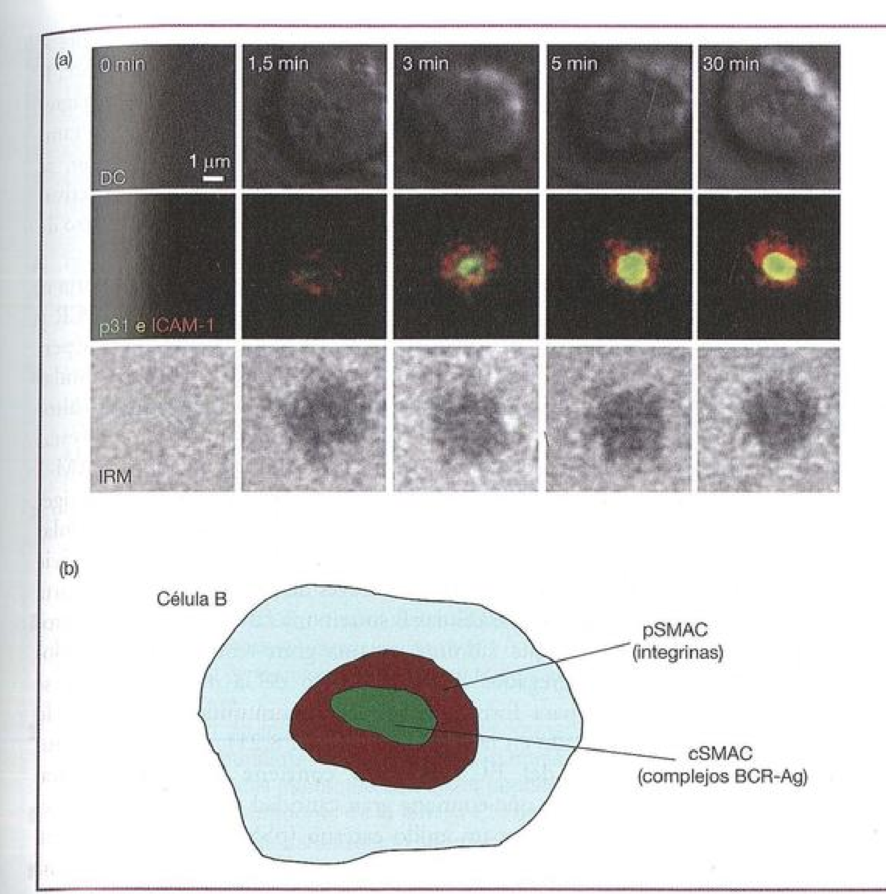


Figura 8.21. Sinapsis inmunitaria del receptor de célula B (BCR).

a) Imágenes de la sinapsis inmunitaria de BCR. Cuantificación en tiempo real del reclutamiento del antígeno y de ICAM-1 para la sinapsis de la célula B. Las células B vírgenes estaban asentadas sobre las bicapas lipídicas planares que contenían ICAM-1 unido a glucosilfosfatidilinositol (GPI) *(rojo)* y al antígeno p31 *(verde)*. Los paneles centrales muestran la acumulación del antígeno p31 *(verde)* e ICAM-1 *(rojo)* en el patrón de una sinapsis madura en momentos especificados. Los paneles superior e inferior muestran imágenes de microscopia de contraste por interferencia diferencial y de reflexión por interferencia en los mismos tiempos. (Reproducido con autorización de Carrasco Y.R., Fleire S.J., Cameron T., Dustin M.L., Batista ED. [2004], *Immunity* **20**, 589-599, © Elsevier). b) Representación esquemática de la sinapsis inmunitaria del BCR que muestra el complejo de activación supramolecular central (cSMAC) que está enriquecido de microagregados de BCR-Ag y el complejo de activación supramolecular periférico (pSMAC) que está enriquecido en integrinas, como LFA-1/ICAM-1.

te sobre las células B activadas y no en las que están en reposo.

Es probable que los inmunocomplejos inmunes sobre las células dendríticas foliculares en los centros germinativos de los folículos secundarios puedan ser captados por las células B para su presentación a las células T *helper*, pero, además, los complejos podrían establecer entrecruzamientos con la sIg de los blastos de células B e impulsar su proliferación de una manera independiente de la célula T. Esto aumentaría por la presencia de C3 en los complejos dado que el receptor de complemento de las células B (CR2) es comitógeno.

Atenuación de la activación de las células B

Ya hemos comentado cómo puede disiparse la exacerbación de las células T para el antígeno mediante la ocupación de CTLA-4; mecanismos similares también funcionan para atenuar las señales que se emiten a través del BCR. Varios receptores de superficie de la célula, como FcγRIIB, CD22 y PIRB (receptor de la célula B similar a la inmunoglobulina), han sido vinculados con un papel antagónico de la activación de la célula B a través del reclutamiento de la proteína tirosinfosfatasa SHP-1 en los **ITIM** (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*; **motivos inhibidores del inmunorreceptor basado en tirosina**) en sus colas citoplasmáticas. SHP-1 afecta la señalización de BCR porque antagoniza los efectos de la cinasa Lyn sobre Syk y Btk; mediante la desfosforilación de ambas proteínas, SHP-1 bloquea el reclutamiento de PLCγ2 en el complejo BCR. En consecuencia, es probable que la coligación del BCR con cualquiera de estos receptores bloquee la activación de la célula B. CD22 parece estar asociado constitutivamente con el BCR en las células B en reposo y de este modo puede elevar el umbral para la activación de la célula B. La formación exitosa de la sinapsis del receptor de la célula B puede excluir físicamente al CD22 del complejo BCR.

Interacciones dinámicas en la sinapsis BCR

Al igual que los TCR forman sinapsis inmunitarias durante el contacto con el complejo péptido-CMH, también se determinó que los receptores de las células B muestran un comportamiento similar, sobre todo cuando el antígeno es presentado sobre una superficie de membrana. Mientras que las células B pueden ser estimuladas por un antígeno soluble, es ahora ampliamente aceptado que **la forma principal del antígeno que desencadena la activación de las células B *in vivo* está localizada en las superficies de la membrana.** Los involucrados más probables aquí son las células dendríticas foliculares que residen dentro de los ganglios linfáticos, así como los macrófagos y las células dendríticas que migran allí y tienen tributos del antígeno. Los antígenos pueden estar inmovilizados en las superficies de la célula por receptores del complemento o Fc como inmunocomplejos, o mediante la unión directa a varios receptores depuradores (*scavenger*). El encuentro entre una célula B y el antígeno asociado a la membrana ofrece la oportunidad de que la membrana de la célula B se extienda a lo largo de la membrana opuesta, a fin de reunir el antígeno suficiente

para desencadenar la activación de las células B, así como para proporcionar la posibilidad de que se realicen otros contactos como los que pueden ser provistos por las integrinas de membrana. Esta respuesta de extensión es impulsada por la ocupación del BCR por el antígeno en el frente de avance (*leading edge*) de la célula B y, aparte de aumentar el número de contactos de BCR-antígeno que estarán disponibles para desencadenar la activación de las células B, la respuesta de extensión **también aumenta la cantidad de antígeno que en última instancia se concentra y es internalizado por la célula B**; esto conduce a la presentación más eficaz del antígeno a las células T activadas cuando la célula B busca con posterioridad la ayuda de la célula T (Figura 8.20).

La célula que se extiende en respuesta a la ocupación del BCR con el antígeno específico se activa en respuesta a las señales propagadas a través del BCR; en este proceso, Lyn y Syk son especialmente importantes. Está claro que la extensión a lo largo de una superficie que tiene el antígeno requiere una amplia reorganización del citoesqueleto. Aunque esto aún no se comprende por completo, la activación de Vav que, como se mencionó antes, está implicado en la regulación del citoesqueleto a través de Rac y Rho, es esencial aquí.

Hay pruebas de que los BCR dentro de las células B en reposo no están dispersos al azar dentro de la membrana citoplasmática, sino que están confinados a ciertas zonas, con difusión libre restringida por contactos con el citoesqueleto de actina subyacente. En consonancia con ello, se demostró que la interrupción de la red de actina en las células B conduce a la señalización espontánea dependiente del calcio del BCR, tal vez debido a la formación espontánea de **microagregados de BCR**. Así, el citoesqueleto parece desempeñar una función importante en restringir la distribución superficial y el comportamiento de los BCR en una célula B en reposo. La unión de un antígeno multivalente al BCR puede alterar la disposición de los BCR en la célula B en reposo y dar como resultado la formación de microagregados del BCR que contiene de 50 a 500 BCR; esto también depende de un citoesqueleto intacto. De hecho, se encontró que la red de actina dentro de las células B activadas rodea o encierra a los microagregados de BCR dentro de la membrana citoplasmática.

La extensión de las células B en la superficie que porta el antígeno aumenta el número de microagregados de BCR y finalmente ocupa un número suficiente de BCR para permitir cruzar el umbral de activación de las células B. Similar a las células T, las células B maduras también expresan altos niveles de integrinas LFA-1 y VLA-4. La interacción de estas moléculas de adhesión con sus ligandos cognados, ICAM-1 y VCAM-1/fibronectina, en la célula que muestra el antígeno inmovilizado también favorece la adhesión de las células B y facilita la extensión celular a lo largo de la superficie diana. Tras la extensión a través de una superficie que porta el antígeno, las células B sufren una fase de contracción prolongada que culmina en una gran reorganización de los microagregados de BCR dentro de la membrana que se unen para formar una sinapsis inmunitaria, similar a lo observado en las células T (Figura 8.21). La sinapsis inmunitaria del BCR maduro contiene un anillo central (cSMAC) que contiene gran cantidad de complejos antígeno-BCR, con un anillo externo (pSMAC) enriquecida en integrinas (Figura 8.21). No sólo los contactos de integrina promueven la extensión y adhesión entre los pares de celda que interactúan entre sí, sino que evidencias recientes sugieren también que estos contactos disminuyen el umbral de activación de las células B al reducir la concentración de antígeno necesario para formar una sinapsis estable y activar los linfocitos B.

RESUMEN

Las células T y las células B inmunocompetentes difieren en muchos aspectos

- Los receptores específicos para el antígeno, TCR/CD3 sobre las células T y la Ig de superficie sobre las células B, proporcionan una clara distinción entre estos dos tipos celulares.
- Las células T y B difieren en sus receptores para C3d, IgG y ciertos virus.
- Existen distintos activadores policlonales de las células T (PHA, anti-CD3) y de las células B (anti-Ig, virus de Epstein-Barr).

Los linfocitos T y las células presentadoras de antígeno interactúan a través de pares de moléculas accesorias

- El acoplamiento de las células T y las CPA depende de fuertes interacciones mutuas entre pares moleculares complementarios sobre sus superficies: CMH II-CD4, CMH I-CD8, VCAM-1-VLA-4, ICAM-1-LFA-1, LFA-3-CD2, B7-CD28 (y CTLA-4).
- Las interacciones B7-CTLA-4 son inhibidoras, mientras que las interacciones B7-CD28 son estimuladoras. CTLA-4 puede antagonizar el reclutamiento del TCR a la balsa de lípidos donde residen muchas de las proteínas de señalización asociadas a la membrana.

La activación de las células T requiere dos señales

- Dos señales activan a las células T, pero una sola produce falta de respuesta (anergia) o muerte por apoptosis.
- La señal 1 es proporcionada por la interacción del complejo de baja afinidad TCR-CMH más el péptido.
- La segunda señal coestimuladora (señal 2) es mediada por la unión de CD28 por B7 (CD80/CD86) y amplifica en gran medida las señales generadas a través de las interacciones TCR-CMH.
- Las células T previamente estimuladas sólo requieren sólo una señal, a través de sus TCR, para la activación eficaz.

Activación del receptor de la célula T

- El TCR carece de cualquier actividad enzimática intrínseca, pero se asocia con proteínas accesorias (el complejo correceptor CD3) que pueden reclutar las proteínas tirosincinasas (PTK).
- La señal de TCR es transducida y amplificada a través de una cascada enzimática de la proteína tirosincinasa.
- El reclutamiento de CD4 o CD8 en el complejo TCR conduce a la fosforilación de secuencias de ITAM en las cadenas ξ asociadas al CD3 por la PTK Lck asociada a CD4. Los ITAM fosforilados se unen y activan entonces a la cinasa ZAP-70.

Acontecimientos en cadena tras la señalización del TCR

- Las proteínas adaptadoras no enzimáticas forman complejos multiméricos con cinasas y factores de intercambio del nucleótido guanina (GEF).
- La hidrólisis del difosfato de fosfatidilinositol por las fosfolipasas Cγ1 o Cγ2 produce trifosfato de inositol (IP_3) y diacilglicerol (DAG).
- El IP_3 moviliza el calcio intracelular.
- El DAG y el aumento del calcio activan la proteincinasa C.
- El aumento del calcio junto con la calmodulina también estimula la actividad de la calcineurina.
- La activación de Ras por el factor de intercambio del nucleótido guanina Sos inicia una cascada de cinasas que opera a través de Raf, la MAP cinasa cinasa MEK y la MAP cinasa ERK. El CD28 a través de la cinasa PI3 también puede influir sobre la MAP cinasa.
- Los factores de transcripción Fos y Jun, NFAT y NFκB son activados por MAP cinasa, calcineurina y PKC, respectivamente, y se unen a sitios reguladores en la región promotora de IL-2.
- Una pequeña cantidad de complejos CMH-péptido pueden activar en forma seriada una cantidad mucho mayor de TCR, lo cual proporciona la señal sostenida necesaria para la activación.
- La unión inicial de las integrinas facilita la formación de una sinapsis inmunitaria, cuyo centro intercambia integrinas para que el TCR interactúe con CMH-péptido.
- Las moléculas adaptadoras de la familia Cbl están involucradas en las vías de señalización negativas.
- Los dominios de fosfatasa en CD45 son necesarios para eliminar los fosfatos en los sitios inhibidores sobre las cinasas.

Las células B responden a tres tipos diferentes de antígeno

- Los antígenos timoindependientes de tipo 1 son activadores policlonales focalizados en las células B específicas por receptores sIg.
- Los antígenos timoindependientes de tipo 2 son moléculas poliméricas que forman entrecruzamientos con muchos receptores sIg, y como consecuencia de sus semividas prolongadas, proporcionan una señal persistente para la célula B.
- Los antígenos timodependientes requieren la cooperación de las células T *helper* para estimular la producción de anticuerpos por las células B.
- El antígeno capturado por receptores sIg específicos es captado en la célula B, procesado y expresado sobre la superficie como un péptido en asociación con las moléculas clase II del CMH.
- Este complejo es reconocido por la célula T *helper* que activa a la célula B en reposo.
- La capacidad de las proteínas transportadoras para permitir la respuesta de anticuerpos se explica por la colaboración T-B, en la cual las células T reconocen el transportador, y las células B, el hapteno.

La naturaleza de la activación de las células B

- La formación de entrecruzamientos con los receptores de Ig de superficie (p. ej., por antígenos timoindependientes de tipo 2) activa a las células B.
- Las células T *helper* activan las células B en reposo a través del reconocimiento por el TCR de complejos CMH II-péptido transportador y la coestimulación a través de interacciones CD40L-CD40 (análogo a la segunda señal B7-CD28 para la activación de las células T).
- La coestimulación de la célula B también es proporcionada por el complejo correceptor de célula B, que consiste en CD19, CD21, CD81 y LEU13.
- Los receptores de las células B (BCR) también forman sinapsis inmunitarias constituidas por numerosos microagregados de BCR e integrinas.

LECTURAS ADICIONALES

Abraham R.T. & Weiss A. (2004) Jurkat T-cells and development of the T-cell receptor signaling paradigm. Nature Reviews Immunology 4, 301–308.

Acuto O. & Michel F. (2003) CD28-mediated costimulation: a quantitative support for TCR signaling. Nature Reviews Immunology 3, 939–951.

Batista F.D. & Harwood N.E. (2009) The who, how and where of antigen presentation to B cells. Nature Reviews Immunology 9, 15–27.

Buday L. & Downward J. (2008) Many faces of Ras activation. Biochim Biophys Acta. 1786, 178–187.

Bromley S.K. et al. (2001) The immunological synapse. Annual Review of Immunology 19, 375–396.

Fooksman D.R. et al. (2010) Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. Annual Review of Immunology 28, 1–27.

Grakoui A. et al. (1999) The immunological synapse: a molecular machine controlling T-cell activation. Science 285, 221–227.

Harwood N.E. & Batista F.D. (2010) Early events in B cell activation. Annual Review of Immunology 28, 185–210.

Huang F. & Gu H. (2008) Negative regulation of lymphocyte development and function by the Cbl family of proteins. Immunological Reviews 224, 229–238.

Jenkins M.K. et al. (2001) In vivo activation of antigen-specific CD4 T-cells. Annual Review of Immunology 19, 23–45.

Kinashi T. (2005) Intracellular signaling controlling integrin activation in lymphocytes. Nature Reviews Immunology 5, 546–559.

Kurosaki T. (2002) Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins. Nature Reviews Immunology 2, 354–363.

Mueller D.L. (2010) Mechanisms maintaining peripheral tolerance. Nature Immunology 11, 21–27.

Niiro H. & Clark E.A. (2002) Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. Nature Reviews Immunology 2, 945–956.

Rudd C.E., Taylor A. & Schneider H. (2009) CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. Immunological Reviews 229, 12–26.

Smith-Garvin J.E., Koretzky G.A. & Jordan M.S. (2009) T cell activation. Annual Review of Immunology 27, 591–619.

Yokosuka T. & Saito T. (2009) Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR–CD28 microclusters. Immunological Reviews 229, 27–40.



CAPÍTULO 9
La producción de efectores

Conceptos clave

A modo de resumen...

El lector estará familiarizado con la función central de las células dendríticas maduras como fuentes del complejo CMH-péptido (señal 1) y los ligandos coestimuladores (señal 2) para la activación productiva de las células T vírgenes; la ausencia de la señal 2 conduce a la falta de respuesta o anergia. Las células B pueden también presentar el antígeno y coestimular a una célula T activada previamente, con el fin de recibir colaboración de la célula T para la expansión clonal y la diferenciación a una célula B efectora, pero las células dendríticas son típicamente las principales células presentadoras de antígenos (CPA) para la activación de las células T vírgenes. Los macrófagos también pueden actuar como CPA pero, debido a que su com-

A modo de resumen... *(continuación)*

portamiento es relativamente no migratorio, tienen una participación importante en reestimular las células T previamente activadas en los sitios de infección en lugar de producir el cebado de las células T vírgenes en los tejidos linfoides secundarios. El objetivo de la activación de los linfocitos dirigida por el antígeno es desencadenar la expansión clonal de las células correctas para que estas células puedan ponerse a trabajar para montar una respuesta inmunitaria adaptativa. Esta última actúa en tándem con una respuesta inmunitaria innata en curso y, como veremos, **amplifica y refuerza la respuesta inmunitaria innata a través de la provisión de citocinas, anticuerpos y moléculas citotóxicas**. Las células T activadas se diferencian en **células efectoras** capaces de secretar diversos patrones de citocinas; del mismo modo, las células B activadas se diferencian en plasmocitos capaces de secretar diferentes clases de anticuerpos. Las células del sistema inmunitario innato en general, y las células dendríticas en particular, desempeñan una función clave en la formación de las características particulares de la respuesta inmune adaptativa que se monta en respuesta a la estimulación antigénica. Esto se logra a través de la secreción de diferentes patrones de citocinas en respuesta a la infección inicial. Estas citocinas, a su vez, influyen en la naturaleza de los efectores de células T y B que se producen.

Introducción

Una vez cruzado el umbral requerido para la activación, una célula T estimulada entra en el ciclo de división celular y sufre proliferación clonal y diferenciación a efectores. Tras la activación de las células T, se sobreexpresa una sucesión de genes. Dentro de la primera media hora, se expresan factores de transcripción nucleares, como Fos/Jun y NFAT, que regulan la expresión la interleucina-2 (IL-2) y el protoncogén celular *c-myc,* pero en las horas siguientes tiene lugar la síntesis de una gama de citocinas solubles y sus receptores específicos. Mucho más tarde observamos moléculas como el receptor para transferrina, relacionado con la división celular, y antígenos muy tardíos, como la molécula de adhesión VLA-1, que permite que las células T activadas se unan al endotelio vascular en los sitios de infección. En conjunto, estos acontecimientos equipan a las células T activadas con propiedades funcionales nuevas que comprenden la capacidad de activar macrófagos, la provisión de ayuda mediada por citocinas para la producción de anticuerpos por las células B y la capacidad de eliminar las células diana infectadas por virus al inducir un proceso de apoptosis.

Las células B activadas también ingresan en el ciclo celular y sufren proliferación clonal para aumentar sus categorías. Algunas de las células B activadas se diferencian, por último, en plasmocitos que migran a la médula ósea, donde producen y secretan cantidades grandes de anticuerpos por períodos relativamente prolongados. Aquí consideraremos los aspectos principales relacionados con la adquisición de la función efectora por los linfocitos T y B, y el papel que éstos desempeñan en la respuesta inmunitaria.

Mecanismos efectores

El sistema inmunitario innato utiliza varios mecanismos efectores diferentes para combatir la infección

En el Capítulo 1 vimos que el **sistema inmunitario innato utiliza estrategias diversas** para ocuparse de los microorganismos que han superado con éxito las barreras físicas de la piel y las superficies mucosas. La primera línea de defensa consiste en las células y los factores solubles del sistema inmunitario innato que actúan de inmediato después de la detección de lo no propio en la forma de patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP). Las medidas adoptadas por el sistema inmunitario innato para tratar una infección incipiente varían desde la unión directa de las moléculas solubles de reconocimiento de patrón, como el complemento, la lisozima y la lectina de unión a la manosa, hasta orquestar la destrucción inmediata de un agente patógeno o mejorar la captación fagocítica por macrófagos y neutrófilos. Los macrófagos y los neutrófilos también reconocen directamente y endocitan los microorganismos patógenos por medio de sus receptores de reconocimiento de patrón asociado con la célula. Otras opciones en la eliminación por el sistema inmunitario innato implican el despliegue de basófilos y mastocitos, que utilizan sus enzimas de los gránulos para combatir parásitos extracelulares de gran tamaño. No olvidemos las células *natural killer* (NK), que matan a las células huéspedes que muestran signos de infección viral u otras evidencias de problemas en su interior. También comentamos el papel de células dendríticas como centinelas del sistema inmunitario innato, que sirve para alertar a las células T acerca de una infección en curso mediante la presentación del antígeno dentro del contexto de señales coestimuladoras apropiadas (es decir, ligandos de la familia B7). En resumen, hay varias armas muy eficaces en el arsenal del sistema inmunitario innato que puede entrar en acción a los fines de defender el cuerpo contra las infecciones. No obstante, el sistema inmunitario innato con frecuencia requiere colaboración para hacer frente a patógenos bien adaptados que implementan varias estrategias de evasión inmunitaria para frustrar todos los esfuerzos anteriores. La unidad defensiva viene en la forma de la respuesta inmunitaria adaptativa.

La inmunidad adaptativa también emplea varios mecanismos efectores

El sistema inmunitario adaptativo, formado por los linfocitos T y B, también tiene varias armas disponibles. En el Capítulo 2 describimos la función de los anticuerpos provenientes de las células B como medio de recubrir los microorganismos a los fin de reforzar la lisis mediada por complemento por la vía clásica, o incrementar su captación mediante la fagocitosis mediante los receptores Fc de los macrófagos y los neutrófilos o, de hecho, mediante la simple agregación de los agentes infecciosos que impide su incursión ulterior en los tejidos. Los anticuerpos también pueden ser utilizados en beneficio de las células NK para concentrar sus acciones citotóxicas a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA). Las células T también emplean varias estrategias diferentes para defender el cuerpo de los agentes infecciosos (Figura 9.1). Recordemos que las células T pueden agruparse en dos subdivisiones principales: células T *helper* (Th) y célula T citotóxicas (Tc o LTC), que son seleccionados para reconocer el antígeno presentado en el contexto de moléculas de clase II o de clase I del CMH, respectivamente. Mientras que las célula T *helper* funcionan para ayudar a las células B para formar anticuerpos o para activar la función destructiva de los macrófagos o de las células NK, las células Tc están dotadas de la capacidad de captar y matar las células infectadas por un virus. Como analizaremos con mayor detalle en este capítulo, las **células T *helper* pueden subdividirse aún más en células Th1, Th2 y Th17 sobre la base de los perfiles de citocinas que secretan estas células**, ya que esto les confiere a ellas funciones efectoras diferentes. También describiremos otras subdivisiones de células T (**células T reguladoras [Treg]**), que también difieren en el perfil de citocinas producido; estas células cumplen funciones reguladoras importantes y ayudan a proteger al cuerpo contra respuestas de células T inadecuadas que se dirigen contra lo propio, así como las respuestas excesivas o inadecuadas dirigida hacia lo no propio.

Las citocinas influyen firmemente en la generación así como en la función específica de efectores dentro del sistema inmunitario adaptativo

La producción de diferentes citocinas es fundamental tanto para la maduración como para las funciones efectoras específicas de las células B y T. Ya nos hemos referido en los capítulos anteriores a las diversas funciones de las citocinas y hemos aludido a sus propiedades como moléculas mensajeras que permiten que los distintos elementos del sistema inmunitario se comuniquen entre sí. La comunicación entre las células del sistema inmunitario sustenta la amplificación de las respuestas inmunitarias (Figura 9.1) y cumple también un papel decisivo en conseguir la respuesta adecuada (es decir, si está predominantemente mediada por anticuerpos o por células) dependiendo de la naturaleza del agente infeccioso, así como su vía de entrada en el cuerpo. Aquí, analizaremos con mayor detalle las categorías diferentes de citocinas, cómo actúan estas moléculas en sus células diana

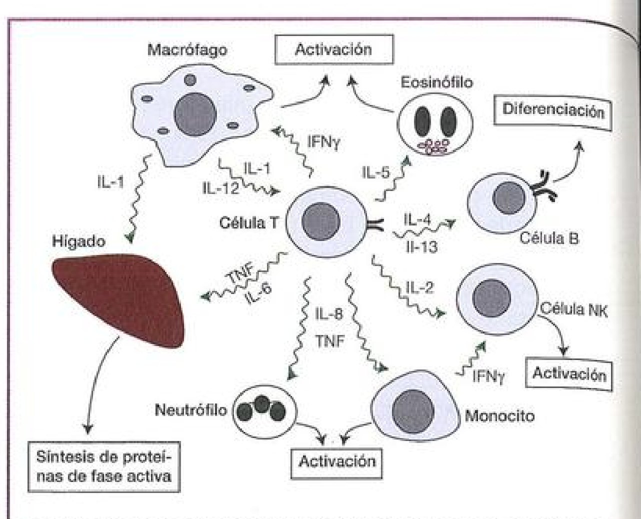


Figura 9.1. Las células T pueden regular diversos elementos del sistema inmunitario a través de la producción de diferentes citocinas.

Esto ilustra algunas, pero no la totalidad, de las interacciones que las células T activadas pueden tener con otros elementos del sistema inmunitario a través de la secreción dirigida de citocinas específicas. Obsérvese que no todas las células T son capaces de secretar todas las citocinas indicadas. En cambio, se generan subpoblaciones específicas de células T que se dedican a la secreción de subconjuntos particulares de las citocinas que se muestran.

y el espectro de respuestas que ellas inician. Todos estos temas son centrales para saber cómo se generan las células efectoras del sistema inmunitario adaptativo y la naturaleza de las respuestas que realizan. Considerando que muchos de los elementos del sistema inmunitario innato están listos para atacar con poco retraso tras la detección de un PAMP, **las acciones de los linfocitos T y B están muy influenciadas por el entorno de citocinas que acompaña su exposición inicial al antígeno específico.**

Las células dendríticas y otras células del sistema inmunitario innato desempeñan una función central en la generación de efectores

Como describiremos más adelante en este capítulo, una gran influencia sobre el tipo de células efectoras generadas en respuesta a un desafío patógeno es ejercida por las células dendríticas que, además de presentar el antígeno (señal 1) y proporcionar señales coestimuladoras (señal 2) a las células T, también ejercen un control significativo sobre el tipo de respuesta de células T que se genera. Las células dendríticas logran esto proporcionando información adicional en la forma de citocinas (señal 3) que determinan la naturaleza de las células T efectoras que así se generan (Figura 9.2). Las combinaciones particulares de citocinas elaboradas por las células dendríticas durante la serie inicial de estimulación de células T en el ganglio linfático influye respecto de si la respuesta estará dominada por la generación de células T efectoras que proporcionan ayuda a las células B (Th2), o alternativamente, produce la generación de células T que activan macrófagos y ayudan a la función del LTC (células Th1). También se ha reconocido la generación de otras subpoblaciones Th, caracterizadas por

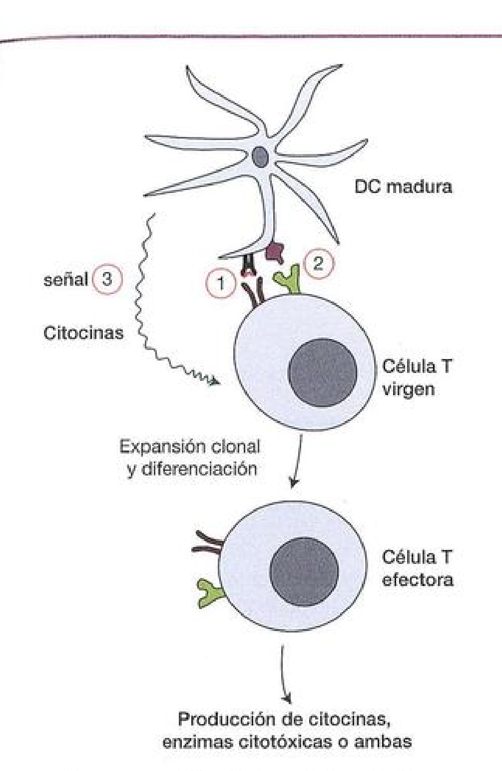


Figura 9.2. La generación de las células T efectoras está influenciada por el entorno de citocina de la célula T en el momento de la activación inicial.

El reconocimiento del complejo CMH-péptido por el TCR representa la señal 1; la coestimulación de CD28 por los ligandos B7 representa la señal 2 y las citocinas producidas por la DC célula dendrítica constituyen señal 3. Obsérvese que el entorno de citocinas tras la reestimulación de una célula T dentro de un tejido infectado también influirá en la naturaleza de la respuesta efectora por la célula T.

patrones particulares de citocinas. El patrón de citocinas secretadas por las células T efectoras diferenciadas puede ser aún más influenciado por los macrófagos locales, las células NK, los basófilos y otras células del sistema inmunitario innato encontradas por las célula T activadas que migran a los sitios de infección. Una vez más, esto es a través de la provisión de citocinas que activan o refuerzan el desarrollo de diferentes subpoblaciones de células T efectoras. Esto inevitablemente plantea el interrogante acerca de qué influye en las células dendríticas para elaborar un patrón de citocinas sobre otro. La respuesta a esto claramente completa el círculo, dado que es la naturaleza de los PAMP la que impulsa en primer lugar la acción de las células dendríticas, así como las citocinas elaboradas por otra células del sistema inmunitario innato tras el encuentro con un agente infeccioso que influyen en el perfil de citocinas adoptado por una células dendríticas activada. Antes de analizar los distintos tipos celulares de linfocitos T y B efectores, haremos un comentario acerca de la diversidad de la familia de citocinas y cómo estas importantes moléculas de comunicación intercelular ejercen sus efectos a nivel molecular.

Las citocinas actúan como mensajeros intercelulares



Las citocinas son polipéptidos estructuralmente diferentes que actúan como moléculas mensajeras que pueden comunicar señales de un tipo celular a otro y, entre otras cosas, puede instruir a la célula para recibir la señal para proliferar, diferenciarse, secretar otras citocinas, migrar o destruirse. Hasta la fecha, se han descrito muchas citocinas diferentes y sin duda quedan otras por descubrirse (Cuadro 9.1). Una de las agrupaciones más importantes de citocinas, para la

Cuadro 9.1. Citocinas: su origen y función. CPA, célula presentadora de antígeno; Endo, endotelio; Epit, epitelio; Fibro, fibroblasto; GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos; IL, interleucina; LIF, factor inhibidor de leucemia; Mac, macrófago; Masto, mastocito; Mono, monocito; NK, *natural killer*; SLF, factor de locus de eslabón; TGFβ, factor de crecimiento transformador β. Obsérvese que no hay un interleucina-14. Esta designación se dio a una actividad que, después de una investigación más profunda, no pudo asignarse sin ambigüedad a una citocina aislada. IL-30 tampoco tiene hasta ahora asignación. IL-8 es miembro de la familia de quimiocinas. Estas citocinas se enumeran por separado en el Cuadro 9.2.

Citocina	Origen	Función efectora
Interleucinas		
IL-1α, IL-1β	Mono, Mac, célula dendrítica, NK, célula B, Endo	Coestimula la activación de células T por aumento de la producción de citocinas, como IL-2 y su receptor; aumenta la proliferación y la maduración de las células B; citotoxicidad por NK; induce IL-1, IL-6, IL-8, TNF, GM-CSF y PGE_2 por los Mac, efecto proinflamatorio por inducción de quimiocinas e ICAM-1 y VCAM-1 en el endotelio; induce fiebre, proteínas de fase aguda, resorción ósea por los osteoclastos
IL-2	Th1	Induce la proliferación de células T y B activadas; aumenta la citotoxicidad por NK, y la destrucción de células tumorales y bacterias por monocitos y Mac
IL-3	Célula T, NK, Masto	Crecimiento y diferenciación de precursores hematopoyéticos; crecimiento de mastocitos
IL-4	Th2, Tc2, NK, T NK, T γδ, Masto	Induce a las células Th2; estimula la proliferación de B, T y mastocitos activados; sobreexpresa las moléculas de clase II del CMH en las células B y Mac, y CD23 en las células B; inhibe la producción de IL-12 y, por lo tanto, inhibe la diferenciación de Th1; aumenta la fagocitosis por los Mac; induce el cambio a IgG1 e IgE

Cuadro 9.1. *Continuación*

Citocina	Origen	Función efectora
Interleucinas		
IL-5	TH2, Masto	Induce la proliferación de eosinófilos y células B activadas; induce el cambio a IgA
IL-6	Th2, Mono, Mac, célula dendrítica, estroma de la médula ósea	Diferenciación de células madre mieloides y de células B en plasmocitos; induce proteínas de fase aguda; aumenta la proliferación de células T
IL-7	Estroma de médula ósea y timo	Induce la diferenciación de las células madre linfoides en células T y B progenitoras; activa las células T maduras
IL-8	Mono, Mac, Endo	Media la quimiotaxis y la activación de neutrófilos
IL 9	Th	Induce la proliferación de timocitos; aumenta el crecimiento de mastocitos; sinergia con IL-4 para el cambio a IgG1 e IgE
IL-10	Th (TH2 en el ratón), Tc, célula B, mono, Mac	Inhibe la secreción de IFNγ en el ratón y de IL-2 por las células Th1 humanas; inhibe las moléculas de clase II del CMH y la producción de citocinas (incluida IL-12) por monocitos, Mac y célula dendrítica, e inhibe por lo tanto la diferenciación de Th1; inhibe la proliferación de células T; aumenta la diferenciación de células B
IL-11	Estroma de médula ósea	Promueve la diferenciación de pro-B y megacariocitos; induce proteínas de fase aguda
IL-12	Mono, Mac, célula dendrítica, célula B	Citocina fundamental para la diferenciación de Th1; induce la proliferación y la producción de IFNγ por Th1, $CD8^+$ y T γδ y NK; aumenta la citotoxicidad por NK y T $CD8^+$
IL-13	Th2, MC	Inhibe la activación y la secreción de citocinas por los Mac; coactiva lo proliferación de células B; sobreexpresa las moléculas de clase II del CMH y CD23 en las células B y los monocitos; induce el cambio a IgGl e IgE; induce VCAM-1 en el endotelio
IL-15	Células T, NK, Mono, Mac, célula dendrítica, célula B	Induce la proliferación de células T, NK y B activadas, y la producción de citocinas y la citotoxicidad en NK y células T $CD8^+$; quimiotáctica para las células T; estimula el crecimiento del epitelio intestinal
IL-16	Th, Tc	Quimiotáctico para células T CD4, monocitos y eosinófilos; induce moléculas de clase II del CMH
IL-17	Célula T	Proinflamatoria; estimula la producción de citocinas como TNF, IL-1β, IL-6, IL-8, G-CSF
IL-17A	Th17, células T NK, neutrófilos	Proinflamatoria; estimula la producción de citocinas como TNF, IL-1β, IL-6, IL-8, G-CSF por los epitelios, los endotelios y los fibroblastos
IL-17F	Th17, células T NK, neutrófilos	Efectos similares a la IL-17A
IL-18	Mac, célula dendrítica	Induce la producción de IFNγ por las células T; aumenta la citotoxicidad por NK
IL-19	Mono	Modulación de la actividad de Th1
IL-20	Mono, queratinocitos	Regulación de las respuestas inflamatorias en la piel
IL-21	Th	Regulación de la hematopoyesis; diferenciación de NK; activación de células B; coestimulación de células T
IL-22	Célula T	Inhibe la producción de IL-4 por Th2
IL-23	Célula dendrítica	Induce la proliferación y la producción de IFNγ por Th1; induce la expansión y la supervivencia de las células TH17, indicción de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 TNF por los macrófagos
IL-24	Th2, Mono, Mac	Inducción de TNF, IL-1, IL-6, actividad antitumoral

Cuadro 9.1. *Continuación*

Citocina	Origen	Función efectora
Interleucinas		
IL-25	Th1, Mac, Masto	Inducción de IL-4, IL-5, IL-13 y patologías asociadas con Th2
IL-26	T, NK	Aumento de la producción de IL-8 e IL-10 por el epitelio
IL-27	Célula dendrítica, Mono	Inducción de respuestas Th1, aumento de la producción de IFN-γ
IL-28	Mono, célula dendrítica	Actividad similar a la IFN de tipo 1, inhibición de la replicación viral
IL-29	Mono, célula dendrítica	Actividad similar a la IFN de tipo 1, inhibición de la replicación viral
IL-30	CPA	Subunidad P28 del heterodímero IL-27. Regula la capacidad de respuesta por IL-12 de las células T vírgenes. Sinergismo con IL-12 para inducir IFNγ
IL-31	Célula T	Favorece las respuestas inflamatorias en la piel
IL-32	NK, célula T	Estimula la inflamación. Actúa en la activación de la apoptosis inducida por células T
IL-33	Estroma, célula dendrítica	Inducción de citocinas Th2, media la quimiotaxis de basófilos y mastocitos
IL-34	Estroma	Estimula la proliferación de monocitos y la formación de progenitores de macrófagos
IL-35	Treg	Efectos inmunosupresores sobre células Th1, Th2 y Th17 Estimula la proliferación de Treg
Factores estimuladores de colonias		
GM-CSF	Th, Mac, Fibro, Mast, Endo	Estimula el crecimiento de progenitores de monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos; activa Mac
G-CSF	Fibro, Endo	Estimula el crecimiento de progenitores de neutrófilos
M-CSF	Fibro, Endo, Epit	Estimula el crecimiento de progenitores de monocitos
SLF	Estroma de médula ósea	Estimula la división de las células madre (ligando c-*kit*)
Factores de necrosis tumoral		
TNF (TNFα)	Th, Mono, Mac, célula dendrítica, Masto, NK, B	Citotoxicidad tumoral; caquexia (pérdida de peso); induce secreción de citocinas; induce la E-selectina sobre el endotelio; activa Mac; antiviral
Linfotoxina (TNFβ)	Th1, Tc	Citotoxicidad tumoral; aumenta la fagocitosis por neutrófilos y Mac; relacionada con el desarrollo de órganos linfoides; antiviral
Interferones		
IFNα	Leucocitos	Inhibe la replicación viral; aumenta las moléculas de clase II del CMH
IFNβ	Fibroblastos	Inhibe la replicación viral; aumenta las moléculas de clase II del CMH
IFNγ	Th1, Tc1, NK	Inhibe la replicación viral; aumenta las moléculas de clases I y II del CMH; activa Mac; induce el cambio a IgG2a; antagoniza varias acciones de IL-4; inhibe la proliferación de Th2
Otras		
TGFβ	Th3, B, Mac, Masto	Proinflamatoria, p. ej., quimiotaxis de monocitos y Mac, pero también antiinflamatoria, p. ej., inhibición de la proliferación de linfocitos; induce el cambio a IgA; promueve la reparación tisular
LIF	Epit. tímico, estroma de médula ósea	Induce proteínas de fase aguda
Eta-1	Célula T	Estimula la producción de IL-12 e inhibe la producción de IL-10 por los Mac
Oncostatina M	Célula T, Mac	Induce proteínas de fase aguda

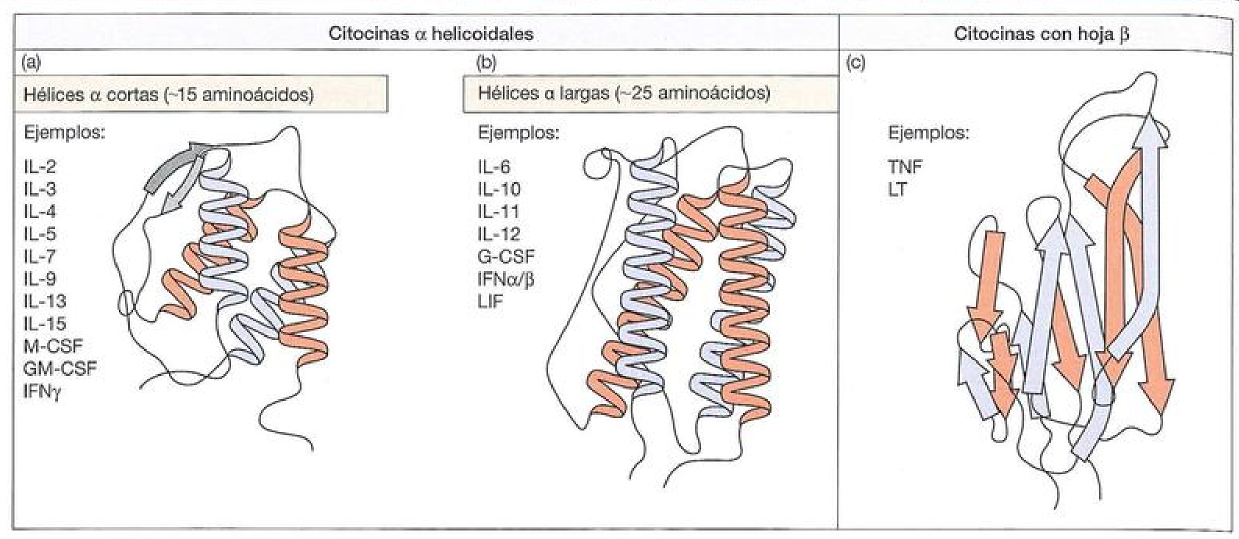


Figura 9.3. Estructuras de las citocinas.

Las citocinas pueden dividirse en algunos grupos estructurales diferentes. Se muestran aquí tres de los tipos principales de estructuras y algunos ejemplos con nombre de cada tipo: a) cuatro hélices α cortas (~15 aminoácidos), b) cuatro hélices α largas (~25 aminoácidos) y c) una estructura de hoja β. (Reproducido con autorización de Michal G [(ed.]) ([1999],) *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.)

manera de pensar del inmunólogo, es la familia de las interleucinas ya que contiene citocinas que actúan como comunicadores entre los leucocitos. Los miembros de esta familia son algo diversos; pertenecen a clases estructurales diferentes (Figura 9.3), porque la clasificación principal para los miembros de esta familia se basa en propiedades biológicas (es decir, evidencia de actividad sobre los leucocitos) en lugar de la homología de secuencia o estructural. De hecho, si bien se conocen homólogos adicionales de la familia interleucina, su clasificación como interleucinas dependerá de datos acerca de si esas proteínas ejercen efectos funcionales sobre los leucocitos. Hasta ahora se han descrito alrededor de 34 interleucinas (IL-1 a IL-35); se pone en duda la pertenencia a esta categoría de la IL-14.

Se han establecido otras familias de citocinas sobre la base de su capacidad de favorecer la proliferación de precursores hematopoyéticos (factores estimulantes de colonias) o la actividad citotóxica hacia tipos celulares transformados (factores de necrosis tumoral), o la capacidad de interferir con la replicación viral (interferones). Sin embargo, es importante destacar que las citocinas ejercen una función mucho mayor que la que sugerirían sus nombres algo descriptivos (y a menudo confusos). De hecho, la respuesta que inducen estas moléculas depende, en gran medida, del contexto en el cual se producen las señales de citocina. Así, factores como el estadio de diferenciación de la célula, su posición dentro del ciclo celular (inactivas o en proliferación) y la presencia de otras citocinas influyen en el tipo de respuesta contra una citocina particular.

La acción de las citocinas es transitoria y habitualmente de corto alcance

De modo característico, las citocinas son proteínas secretadas de bajo peso molecular (15-25 kDa) que median el crecimiento celular, la inflamación, la inmunidad, la diferenciación, la migración y la reparación. Dado que regulan la amplitud y la duración de las respuestas inmunoinflamatorias, deben ser producidas en forma transitoria y estrictamente asociada con la presencia de material extraño. La producción de citocinas también puede suceder en respuesta a la liberación de "señales de peligro" endógenas (es decir, patrones moleculares asociados con el peligro [DAMP]) que delaten la presencia de células que están sufriendo la destrucción por necrosis, un modo de muerte celular que típicamente se observa en situaciones patológicas y que con frecuencia está provocada por agentes infecciosos o lesión tisular (véase el Capítulo 1). Es importante que las secuencias con alto contenido de AU en las regiones no traducidas 3' del mRNA de muchas citocinas preparen a estos mRNA para una degradación rápida y, por lo tanto, aseguren la disminución rápida de estas citocinas en ausencia de la estimulación adecuada. Al contrario de las hormonas endocrinas, la mayoría de las citocinas suele actuar de modo local, de una forma paracrina o incluso autocrina. Por esto, las citocinas provenientes de los linfocitos raras veces persisten en la circulación, pero las células no linfoides pueden ser estimuladas a liberar citocinas por productos bacterianos, las cuales pueden detectarse en el torrente sanguíneo, a menudo en perjuicio del huésped. Por ejemplo, el shock séptico es un cuadro potencialmente mortal que en gran parte se produce como consecuencia de la superproducción masiva de citocinas como TNF e IL-1 en respuesta a la infección bacteriana y resalta la necesidad de mantener un estricto control en la producción de citocina. Ciertas citocinas, como IL-1 y factor de necrosis tumoral (TNF), también existen como formas ancladas a la membrana y pueden ejercer sus efectos estimuladores sin convertirse en solubles.

Las citocinas actúan a través de receptores de la superficie celular

Las citocinas son muy potentes; a menudo actúan en concentraciones fentomolares (10^{-15} M), y se combinan con

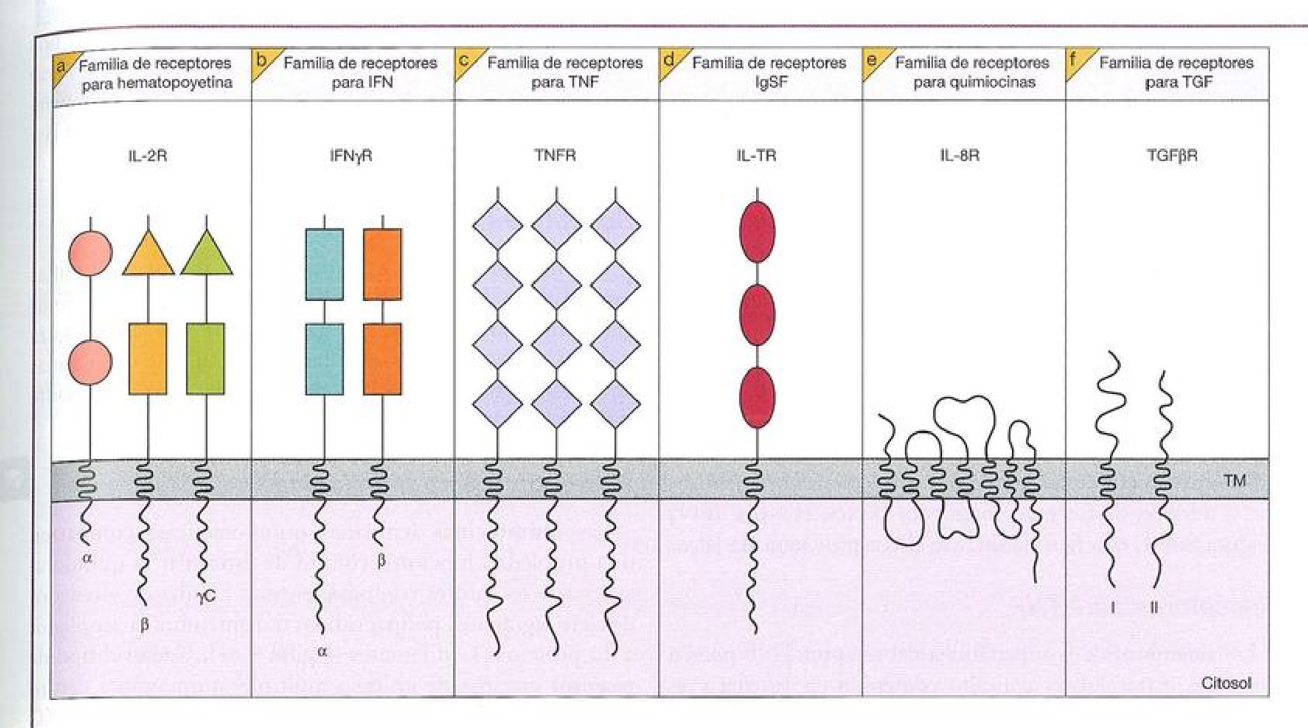


Figura 9.4. Familias de receptores de citocinas.

Se muestra un ejemplo para cada familia. a) Los **receptores para hematopoyetina** operan a través de una subunidad común (γc, βc o gpl30, de acuerdo con la subfamilia) que transduce la señal al interior de la célula. En esencia, la unión de la citocina a su receptor debe iniciar el proceso de señalización al mediar la formación de heterodímeros u homodímeros que comprenden la subunidad común. En algunos casos, la citocina se activa cuando se une al receptor, ya sea en la forma soluble o ligada a la membrana (p. ej., IL-6). El receptor para IL-2 se une a su ligando de un modo interesante. La cadena α (CD25, que reacciona con el Tac monoclonal) del receptor posee dos dominios estructurales proteicos de control del complemento y se une a la IL-2 con baja afinidad; la cadena β (CD122) tiene un dominio estructural de tipo III de fibronectina proximal de membrana y un dominio estructural de receptor de citocina distal de membrana, y se asocia con la cadena γ común (CD132), que tiene una organización estructural similar. La cadena β se une a la IL-2 con afinidad intermedia. La IL-2 se une a la cadena β y se disocia de ella muy rápido, pero los mismos procesos que involucran a la cadena β se producen con una lentitud de dos o tres órdenes de magnitud menor. Cuando las cadenas α,β y γ forman un único receptor, la cadena α se une a IL-2 con rapidez y facilita su unión en un sitio separado sobre la cadena β de la cual sólo puede disociarse en forma lenta. Dado que la afinidad final *(K_d)* se basa en la relación de las constantes de velocidad de disociación y asociación, entonces $K_d = 10^{-4}$ seg^{-1} / 10^7 M^{-1} seg^{-1} = 10^{-11} M, la cual es una afinidad muy alta. La cadena γ por sí sola no se une a la IL-2, pero contribuye a la transducción de la señal. b) La familia de **receptores para interferón** está formada por moléculas heterodiméricas, cada una de las cuales tiene dos dominios de tipo III de fibronectina. c) Los receptores para **TNF** y moléculas afines están formados por un único polipéptido con cuatro dominios TNFR. El receptor se trimeriza con su unión al ligando y, en común con algunos otros receptores, también se encuentra en una forma soluble que, cuando se libera de una célula tras la activación puede actuar como un antagonista. d) Otro grupo de receptores contiene cantidades variadas de **dominios de la superfamilia Ig** mientras que e) los **receptores para quimiocinas** son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G y poseen siete dominios transmembrana hidrófobos. f) La familia final ilustrada son los **receptores para TGF** que requieren la asociación entre dos moléculas, denominadas TGFR de tipo I y TGFR de tipo II, para que se produzca la señalización.

pequeñas cantidades de receptores de la superficie celular de alta afinidad para producir cambios en el patrón de la síntesis de RNA y proteínas en las células sobre las que actúan. Esto se logra a través de activación mediada por el receptor de citocina de las cascadas de transducción de la señal que culminan en la activación de factores de transcripción que dirigen la síntesis de productos génicos nuevos, o aumentan el nivel de los ya existentes, dentro de la célula. El resultado final es un **cambio en el comportamiento o la funcionalidad** de la célula como resultado de estos cambios de expresión de genes. De manera típica, los receptores de citocina poseen dominios de interacción proteína-proteína específica o motivos de fosforilación dentro de sus colas citoplasmáticas para facilitar el reclutamiento de proteínas adaptadoras apropiadas tras la estimulación del receptor. Un tema recurrente en las vías de activación del receptor para citocina es la dimerización o la trimerización inducida por el ligando de las subunidades del receptor, que facilita la propagación de la señal en el interior de la célula a través de la interacción de las colas citoplasmáticas asociadas de manera transitoria. Hay seis familias estructurales principales de receptores para citocinas (Figura 9.4).

Receptores para eritropoyetina

Constituyen la familia más grande, a veces denominada, para simplificar como superfamilia de receptores para citocinas y se nombran después de definir el primer miembro de

esta familia como receptor para eritropoyetina. Estos receptores suelen estar formados por una o dos cadenas polipeptídicas que determinan la unión de las citocinas y una cadena compartida adicional (común o "c") implicada en la transducción de la señal. La cadena γc (CD132) es utilizada por el receptor para IL-2 (Figura 9.4a) y los receptores para IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21, una cadena βc (CDw131) por los receptores para IL-3, IL-5 y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y la cadena compartida gp130 (CD130) por los receptores para IL-6, IL-11, IL-12, oncostatina M, factor neurotrófico ciliar y factor inhibidor de leucemia (LIF; *leukemia inhibitory factor*).

Receptores para interferón

También están constituidos por dos cadenas polipeptídicas y, además de los receptores para IFNα, IFNβ e IFNγ (Figura 9.4b), esta familia incluye el receptor para IL-10.

Receptores para TNF

Los miembros de la superfamilia del receptor TNF poseen dominios extracelulares con alto contenido en cisteína y es más probable que existan como trímeros preformados que sufren un cambio conformacional en sus dominios intracelulares cuando se unen al ligando. Entre ellos se encuentran el receptor para el factor de necrosis tumoral (TNF) (Figura 9.4c) y los receptores relacionados Fas (CD95/APO-1) y TRAIL. Esta familia también contiene los receptores para linfotoxina (LT) y el factor de crecimiento nervioso (NGF, *nerve growth factor*), así como el receptor CD40, que desempeña una función importante en la coetimulación de las células B y las células dendríticas por las células T activadas.

Receptores para las citocinas IgSF

Los miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas son ampliamente utilizados en muchos aspectos de la biología celular. En ellos se incluyen el receptor para IL-1 (Figura 9.4d) y los receptores para el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y el factor de la célula madre (SCF/c-kit).

Receptores para quimiocina

Las **quimiocinas** (citocinas quimiotácticas) comparten una propiedad funcional común de estimular la quimiotaxis, y sus receptores comprenden una familia de alrededor de siete segmentos polipeptídicos transmembrana acoplados a 20 proteínas G diferentes (Figura 9.4e). Cada subtipo de receptor es capaz de unirse a múltiples quimiocinas dentro de la misma familia. Por ejemplo, el receptor 2 CXC (CXCR2) es capaz de unirse a siete ligandos diferentes dentro de la familia del ligando CXC (CXCL).

El reclutamiento de células T, macrófagos y neutrófilos a un sitio inflamatorio se mejora enormemente por la acción

Cuadro 9.2. Quimiocinas y sus receptores. Las quimiocinas se agrupan según la disposición de sus cisteínas (véase el texto). La letra L designa ligando (es decir, la quimiocina individual), mientras que la letra R designa receptores. Los nombres entre paréntesis se refieren a los homólogos murinos de la quimiocina humana donde los nombres difieren, o la quimiocina murina sola si no se ha descrito ningún equivalente humano. B, célula B; Baso, basófilo; Eosino, eosinófilo; Mac, macrófago; MEC, quimiocina del epitelio de la mucosa; Mono, monocito; NK, *natural killer*; T, célula T.

Familia	Quimiocina	Nombres alternativos	Quimiotaxis	Receptores
CXC	CXCL1	GROα/MGSAα	Neutro	CXCR2>CXCR1
	CXCL2	GROβ/MGSAβ	Neutro	CXCR2
	CXCL3	GROγ/MGSAγ	Neutro	CXCR2
	CXCL4	PF4	Eosino, Baso, célula T	CXCR3-B
	CXCL5	ENA-78	Neutro	CXCR2
	CXCL6	GCP-2/(CKα-3)	Neutro	CXCR1, CXCR2
	CXCL7	NAP-2	Neutro	CXCR2
	CXCL8	IL-8	Neutro	CXCR1, CXCR2
	CXCL9	Mig	T, NK	CXCR3-A, CXCR3-B
	CXCL10	IP-I0	T, NK	CXCR3-A, CXCR3-B
	CXCL11	I-TAC	T, NK	CXCR3-A, CXCR3-B
	CXCL12	SDF-1α/β	T, B, célula dendrítica, Mono	CXCR4
	CXCL13	BLC/BCA-1	B	CXCR5
	CXCL14	BRAC/Bolecina	?	Célula dendrítica, Mono

Cuadro 9.2. *Continuación*

Familia	Quimiocina	Nombres alternativos	Quimiotaxis	Receptores
	CXCL15	Lungcina	Neutro	?
C	CXCL16	Ninguno	T, NKT	CXCR6
	XCL1	Linfotactina/SCM-lα/ATAC	T	XCR1
	XCL2	SCM-1β	T	XCR1
CX3C	CX3CL1	Fractalcina/Neurotactina	T, NK, Mono	CX3CR1
CC	CCLI	I-309/(TCA-3/P500)	Mono	CCR8
	CCL2	MCP-1/MCAF	T, NK, célula dendrítica, Mono, Baso	CCR2
	CCL3	MIP-lα/LD78α	T, NK, célula dendrítica, Mono, Eosino	CCRl, CCR5
	CCL4	MIP-1β	T, NK, célula dendrítica, Mono	CCR5
	CCL5	RANTES	T. NK, célula dendrítica, Mono, Eosino, Baso	CCR1, CCR3, CCR5
	(CCL6)	(ClO/MRP-1)	Mono, Mac., T, Eosino	CCR1
	CCL7	MCP-3	T, NK, célula dendrítica, Mono, Eosino, Baso	CCR1, CCR2, CCR3
	CCL8	MCP-2	T, NK, célula dendrítica, Mono, Baso	CCR3
	(CCL9/10)	(MRP-2/CCF18/MIP-1γ)	T, Mono	CCR1
	CCL11	Eotaxina-1	T, célula dendrítica, Eosino, Baso	CCR3
	(CCL12)	(MCP-5)	T, NK, célula dendrítica, Mono, Baso	CCR2
	CCL13	MCP-4	T, NK, célula dendrítica, Mono, Eosino, Baso	CCR2, CCR3
	CCL14	HCC-1/HCC-3	T, Mono, Eosino	CCR1
	CCL15	HCC-2/Leucotactina-I/MIP-1δ	T	CCRl, CCR3
	CCL16	HCC-4/LEC/(LCC-1)	T	CCR1
	CCL17	TARC	T, célula dendrítica, Mono	CCR4
	CCL18	DCCK1/PARC/AMAC-1	T, célula dendrítica	?
	CCL19	MIP-3β/ELC/Exodus-3	T, B, célula dendrítica	CCR7
	CCL20	MIP-3α/LARC/Exodus-1	Célula dendrítica	CCR6
	CCL21	6Ccina/SLC/Exodus-2/(TCA-4)	T, célula dendrítica	CCR7
	CCL22	MDC/STCP-1/ABCD-1	T, célula dendrítica, Mono	CCR4
	CCL23	MPIF-1	T	CCR1
	CCL24	MPIF-2/Eotaxina-2	T, célula dendrítica, Eosino, Baso	CCR3
	CCL25	TECK	T, célula dendrítica, Mono	CCR9
	CCL26	SCYA26/Eotaxina-3	T	CCR3
	CCL27	CTACK/ALP/EScina	T	CCR10
	CCL28	MEC	T, B, Eosino	CCR3/CCR10

de las quimiocinas. Éstas pueden ser producidas por una variedad de tipos celulares y se dividen en cuatro familias sobre la base de la disposición de los primeros dos (N-terminal) de los cuatro residuos canónicos de cisteína (Cuadro 9.2). Las quimiocinas CXC tienen un aminoácido, y CX3C tienen tres aminoácidos entre los dos cisteínas. Las quimio-

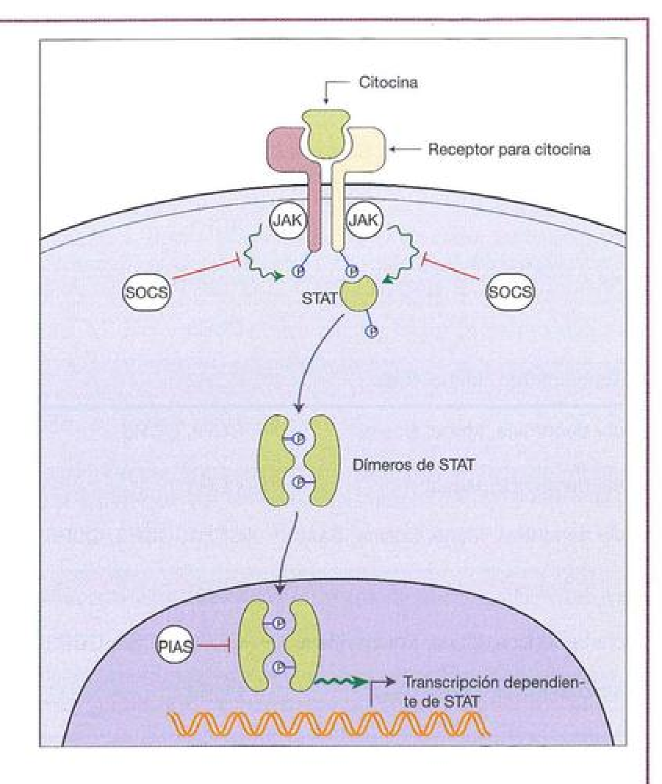


Figura 9.5. Vías para la transcripción génica mediadas por receptores para citocinas.

La oligomerización de los receptores, inducida por las citocinas, activa las JAK cinasas asociadas de manera constitutiva con las colas citoplasmáticas del receptor. Tras la activación, las JAK cinasas fosforilan los residuos de tirosina dentro de las colas del receptor y, en consecuencia, crean sitios de unión para los factores de transcripción STAT que entonces son reclutados en el complejo receptor y, a su vez, son fosforilados por las JAK. La fosforilación de los STAT activa su disociación del receptor y promueve la formación de dímeros de STAT que se translocan al núcleo para dirigir la transcripción de genes que tienen motivos de unión apropiados dentro de sus regiones promotoras. Los miembros de la familia de inhibidores SOCS pueden suprimir la señalización de citocinas en varios puntos, o a través de la inhibición directa de la actividad de la JAK cinasa o al promover la poliubicuitinación y la degradación de las JAK mediada por proteasoma. La familia PIAS de inhibidores de STAT puede formar complejos con las proteínas STAT que dan por resultado la disminución de la unión de STAT al DNA o el reclutamiento de correpresores transcripcionales que pueden bloquear la transcripción mediada por STAT. Los receptores para citocina también pueden reclutar proteínas adaptadoras adicionales como Shc, Grb2 y Sos, que pueden activar las cascadas de señalización de MAP cinasa (véase la Figura 8.8) y PI3 cinasa, que se han omitido para mayor claridad.

cinas CC tienen cisteínas adyacentes en ese lugar, mientras que las quimiocinas C carecen de las cisteínas 1 y 3 halladas en otras quimiocinas. Las quimiocinas se unen a los siete receptores transmembrana acoplados a la proteína G (Figura 9.4). A pesar de que una única quimiocina puede a veces unirse a más de un receptor y un único receptor puede unirse a varias quimiocinas, muchas quimiocinas muestran una intensa especificidad tisular y de receptor. Esto desempeña funciones importantes en la inflamación, el desarrollo de órganos linfoides, la circulación celular la compartimentación celular dentro de los tejidos linfoides, la angiogénesis y la curación de heridas.

Receptores para TGF

Los receptores para los factores transformadores de crecimiento, como el receptor TGFβ (Figura 9.4f), poseen dominios de señalización citoplasmática con actividad de serina/treonina cinasa.

Transducción de señales a través de los receptores para citocina

La homodimerización o la heterodimerización de las subunidades del receptor de citocinas inducida por el ligando representa un tema común para la señalización por citocinas. Las dos vías principales utilizadas son las de Janus (JAK)-STAT cinasa y de Ras-MAP cinasa. Ya hemos analizado los detalles de la vía Ras-MAP cinasa en el Capítulo 8 (véase la Figura 8.8), de modo que aquí nos centraremos en la vía JAK-STAT.

Los miembros de la superfamilia del receptor para citocina (receptores para eritropoyetina) carecen de dominios catalíticos, pero se asocian constitutivamente con una o más JAK (Figura 9.5). Hay cuatro miembros de la familia JAK de mamíferos: JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2 (tirosincinasa 2), y todas fosforilan en cadena sus sustratos en los residuos de tirosina. Los estudios de desactivación génica han demostrado que las diversas JAK tienen funciones altamente específicas y producen fenotipos letales o graves que se relacionan con defectos en el desarrollo linfoide, alteraciones de la eritropoyesis e hipersensibilidad contra patógenos.

Tras la dimerización del receptor inducida por citocina, las JAK se fosforilan recíprocamente, y por lo tanto, se activan entre sí. Las JAK activas fosforilan luego los residuos de tirosina específicos en las colas citoplasmáticas del receptor con el fin de crear sitios de acoplamiento para los miembros de la familia **STAT** (transductores de señales y activadores de la transcripción) de los factores de la transcripción que contienen el dominio SH2. Los STAT residen en el citoplasma en un estado inactivo pero, tras el reclutamiento en los receptores para citocina (por medio de sus dominios SH2), son fosforilados por las JAK y sufren la dimerización y la disociación del receptor. Los STAT dimerizados se translocan después al núcleo y desempeñan una función importante al impulsar la célula a través del ciclo mitótico mediante la activación de la transcripción de varios genes (Figura 9.5). Se han descrito siete STAT de mamíferos, y cada uno desempeña una función relativamente no redundante en las vías de señalización de diversas citocinas. Cada citocina suele emplear más de un tipo de STAT para ejercer sus efectos biológicos; esto se debe a que los receptores de eritropoyetina están compuestos por dos cadenas diferentes de receptores capaces de reclutar proteínas STAT distintas. Se agrega aún mayor complejidad debido a la capacidad de los STAT de formar heterodímeros entre sí, con el resultado de que una sola citocina puede ejercer sus efectos transcripcionales por medio de una batería de combinaciones de STAT. Las JAK también pueden actuar a través de la familia de src

cinasas para generar otros factores de transcripción por la vía de Ras-MAP cinasa (véase la Figura 8.8). Algunas citocinas también activan la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y la fosfolipasa C (PLCγ).

La inhibición de la señalización JAK-STAT es llevada a cabo por proteínas que pertenecen a las familias SOCS (supresor de señalización de citocina) y PIAS (proteína inhibidora de STAT activada) (Figura 9.5). La inducción de las proteínas SOCS se produce de una manera dependiente de STAT y, por lo tanto, representan un mecanismo de inhibición por retroalimentación clásico en el que las señales de citocina inducen la expresión de proteínas que atenúan sus propias cascadas de señalización. La familia SOCS contiene ocho miembros (CIS y SOCS1 a SOCS7), y estas proteínas utilizan dos mecanismos diferentes para inhibir las señales de citocina. Por un lado, las proteínas SOCS pueden interactuar con las JAK y con otras proteínas de señalización como Vav, y dirigir estas proteínas para la degradación por la vía ubicuitina-proteasoma. De manera alternativa, las proteínas de la familia SOCS pueden interactuar con los sitios de unión del dominio SH2 que se encuentran dentro de las asas de activación de los dominios de la JAK cinasa y así bloquean el acceso de las JAK a sus sustratos (Figura 9.5). Algunos miembros de la familia SOCS, como CIS (dominio de homología src 2 que contiene [SH2] inducible por citocinas), también puede interactuar directamente con los dominios SH2 de unión a STAT, que se hallan en los receptores para citocina y determinan así el reclutamiento de moléculas STAT que pueden bloquear al complejo receptor. La deleción dirigida de los genes SOCS en el ratón ha revelado la importancia de estas proteínas para la señalización normal de citocinas. Los ratones deficientes en SOCS-1 muestran un retraso marcado del crecimiento y linfocitopenia, y mueren por insuficiencia multiorgánica asociada con inflamación en el transcurso de las 3 semanas posteriores a su nacimiento. Conforme con el papel de las proteínas SOCS como reguladores negativos de la señalización de citocinas, los linfocitos provenientes de ratones deficientes en *SOCS-1* sufren activación espontánea incluso en situaciones en las que no participan patógenos. Los ratones deficientes en *SOCS-1* generados sobre una base de deficiencia en *RAG2* no presentan ninguno de los fenotipos observados de acuerdo con una base genética normal, lo cual confirma que SOCS-1 ejerce sus efectos principalmente dentro del compartimiento de los linfocitos.

Los cuatro miembros de la familia PIAS (PIAS1, PIAS3, PIASX y PIASY) pueden reprimir la actividad transcripcional inducida por STAT mediante la interacción con estas proteínas para restringir su capacidad de obrar recíprocamente con los elementos promotores del DNA a los que se asocian o, de manera alternativa, mediante el reclutamiento

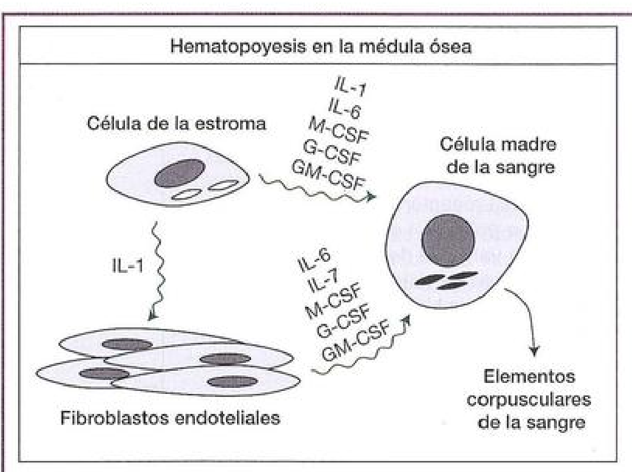


Figura 9.6. Varias citocinas producidas por las células T efectoras y otras células del sistema inmunitario pueden influir en la hematopoyesis.

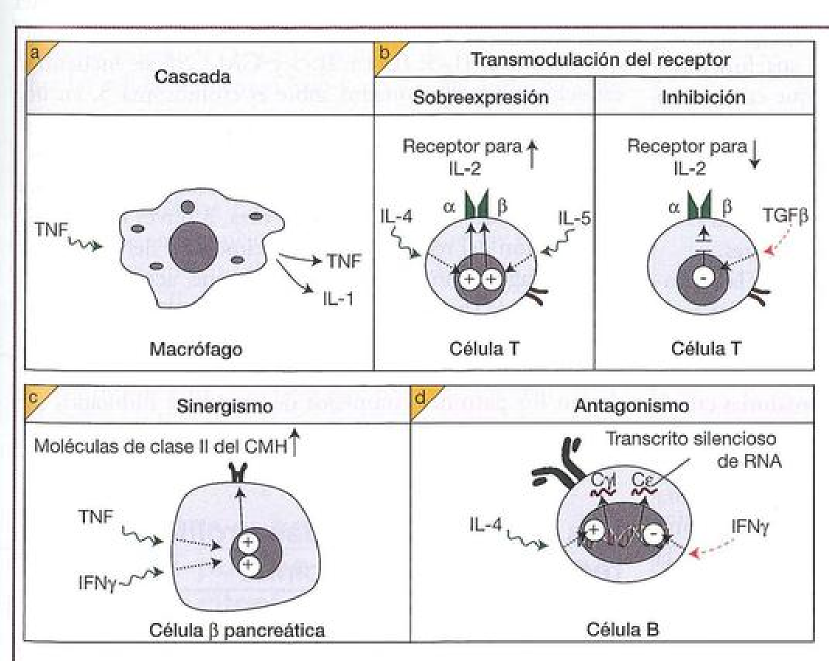
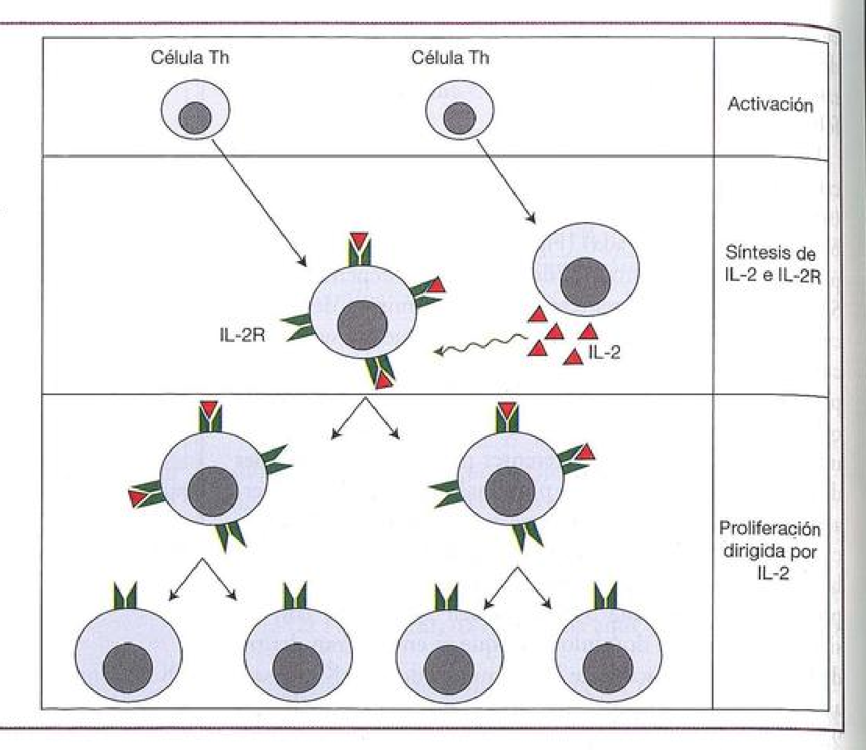


Figura 9.7. Red de interacciones de las citocinas.

a) Cascada: en este ejemplo, el TNF induce la secreción de IL-1 y la propia (autocrina) del macrófago. (Obsérvese que todos los diagramas de esta figura están simplificados, ya que los efectos sobre el núcleo se deben a mensajeros, como resultado de la combinación de la citocina con su receptor de superficie.) b) Transmodulación del receptor, que muestra la sobreexpresión de cada cadena que forma el receptor para IL-2 de alta afinidad en una célula T activada por citocinas individuales y la inhibición por TGFβ. c) Sinergismo de TNF e IFNγ en la sobreexpresión de las moléculas de clase II del CMH de superficie sobre las células secretoras de insulina pancreáticas cultivadas. d) Antagonismo de IL-4 e IFNγ sobre la transcripción de mRNA silencioso ("estéril") que se relaciona con el cambio de isotipo (véase la Figura 9.24).

Figura 9.8. Los blastos T activados que expresan receptores de superficie para IL-2 proliferan en respuesta a la IL-2.

La IL-2 es producida por estos blastos o por otra subpoblación de células T. La expansión es controlada a través de la inhibición del receptor para IL-2 por la propia IL-2. La población expandida secreta una amplia variedad de citocinas activas desde el punto de vista biológico, de las cuales la IL-4 también aumenta la proliferación de las células T.



de las proteínas correpresoras transcripcionales como la histona desacetilasa en los complejos transcripcionales STAT (Figura 9.5).

Las vías JAK-STAT también pueden ser reguladas por otros mecanismos como, por ejemplo, el antagonismo de la actividad de JAK mediada por la proteína tirosinfosfatasa.

Las citocinas a menudo tienen múltiples efectos

En general, las citocinas son **pleiotrópicas**, es decir que ejercen múltiples efectos sobre distintos tipos celulares (Cuadro 9.1); además existe entre ellas una superposición y una *redundancia* considerables respecto de sus funciones individuales, lo cual se explica en parte porque comparten componentes de receptores y la utilización de factores de transcripción comunes. Por ejemplo, muchas de las actividades biológicas de la IL-4 se superponen con las de la IL-13. Sin embargo, debe destacarse que casi todas las citocinas tienen al menos algunas propiedades singulares.

Las citocinas producidas en las etapas iniciales de la activación de las células T y B influyen de manera sustancial en el destino ulterior del desarrollo de la célula en el extremo que las reciben. Sus funciones en la generación de células T y B efectoras y en la regulación de reacciones inflamatorias crónicas (Figura 9.1) se analizarán en forma extensa más adelante en este capítulo. Debemos destacar aquí la importante función de las citocinas en el control de la hematopoyesis (Figura 9.6). La diferenciación de las células madre, para convertirse en los elementos corpusculares de la sangre dentro de la médula ósea, es cuidadosamente nutrida a través de la producción de citocinas por las células de la estroma. Éstas incluyen GM-CSF, G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos), M-CSF, IL-6 e IL-7 y LIF (Cuadro 9.1), y muchas de ellas también derivan de las células T y de los macrófagos. No sorprende, por lo tanto, que durante el período de inflamación crónica las citocinas que se producen recluten nuevos precursores en la vía de diferenciación hematopoyética, un ejercicio útil en esas circunstancias. Una de las citocinas, IL-3, se destaca por su capacidad excepcional para dar sostén a las primeras células de esta vía, sobre todo en sinergismo con IL-6 y G-CSF (Figura 9.6).

Interacciones en red

Las relaciones complejas e integradas entre las diferentes citocinas son mediadas por fenómenos celulares. Los genes que codifican IL-3, IL-4 e IL-5 y GM-CSF se encuentran estrechamente relacionados sobre el cromosoma 5, en una región que contiene genes que codifican M-CSF y su receptor y otros factores de crecimiento y receptores. La interacción puede producirse mediante una cascada en la cual una citocina induce la producción de otra, a través de la transmodulación del receptor para otra citocina y del sinergismo o el antagonismo de dos citocinas que actúan sobre la misma célula (Figura 9.7). Dado el número de combinaciones posibles y el descubrimiento periódico de nuevas citocinas, el medio por el cual las células diana integran e interpretan los patrones complejos de estímulos inducidos por estos factores solubles múltiples sólo se desarrollan lentamente.

Las células T activadas proliferan en respuesta a las citocinas

En lo que concierne a las células T, la proliferación clonal que sigue a la activación depende de manera fundamental de la IL-2 (Figura 9.8). Esta citocina es un péptido único,

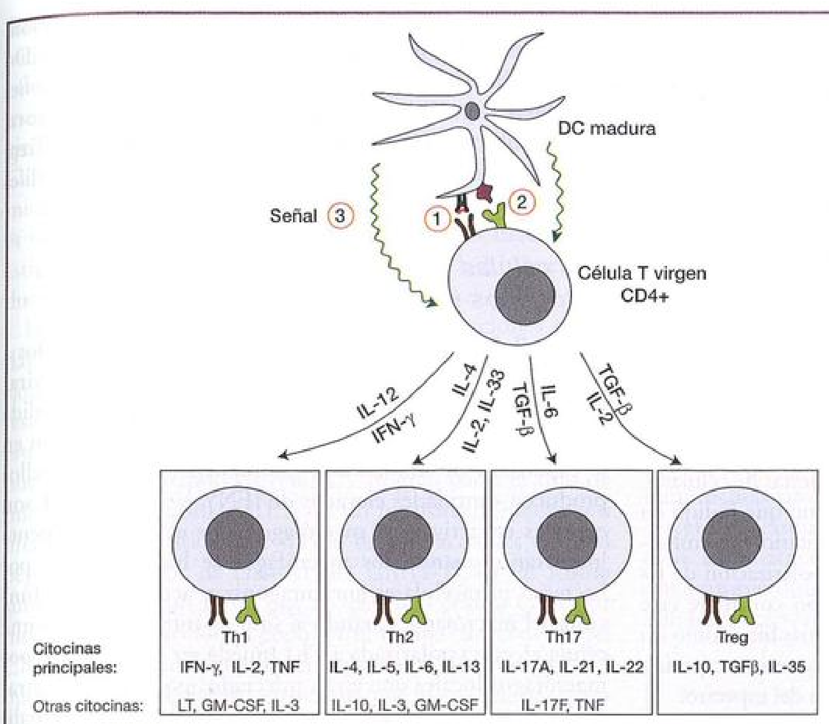


Figura 9.9. Las células T pueden sufrir polarización hacia subpoblaciones separados que secretan diferentes combinaciones de citocinas.

Las células T vírgenes pueden sufrir activación y polarización hacia distintas subpoblaciones de células Th. Las citocinas producidas por las células dendríticas (DC) u otras células de la inmunidad innata, que representan la señal 3, determinan el destino de diferenciación de la célula T, como se muestra.

de peso molecular 15,5 kDa, que sólo actúa sobre células que expresan receptores para IL-2 de alta afinidad (Figura 9.4). Estos receptores no están presentes en las células en reposo, pero son sintetizados a las pocas horas de su activación. Las células T activadas se dividen con rapidez durante 4-5 días, de un modo dependiente de la IL-2, y después se diferencian en distintas subpoblaciones efectoras, como describiremos más adelante.

La separación de una población de células T activadas en células con receptores para IL-2 de alta afinidad y de baja afinidad demostró con claridad que es obligatorio un número suficiente de receptores de alta afinidad para la acción mitogénica de la IL-2. Las cantidades de estos receptores sobre las células aumentan bajo la acción del antígeno y de IL-2, y a medida que el antígeno es eliminado, el número de receptores disminuye y, con ello, la reactividad a la IL-2. Se debe apreciar que, si bien la IL-2 es un factor de crecimiento de las células T inespecífico desde el punto de vista inmunitario, sólo funciona apropiadamente en respuestas específicas porque las células T no estimuladas no expresan receptores para IL-2 de alta afinidad.

Como veremos, las células T activadas también producen una cantidad extraordinaria de otras citocinas, y el efecto proliferativo de la IL-2 es reforzado por la acción de la IL-4 y, en cierta medida, de la IL-6, que reaccionan con los receptores correspondientes de las células T en división.

Las diferentes subpoblaciones de células T pueden elaborar distintos patrones de citocinas

Ya vimos que pueden generarse diferente tipos de células T. Aparte de las grandes subpoblaciones de células T restringidas por CD4 y CD8, **puede detectarse una subfuncionalización más de las células sobre la base de los patrones de**

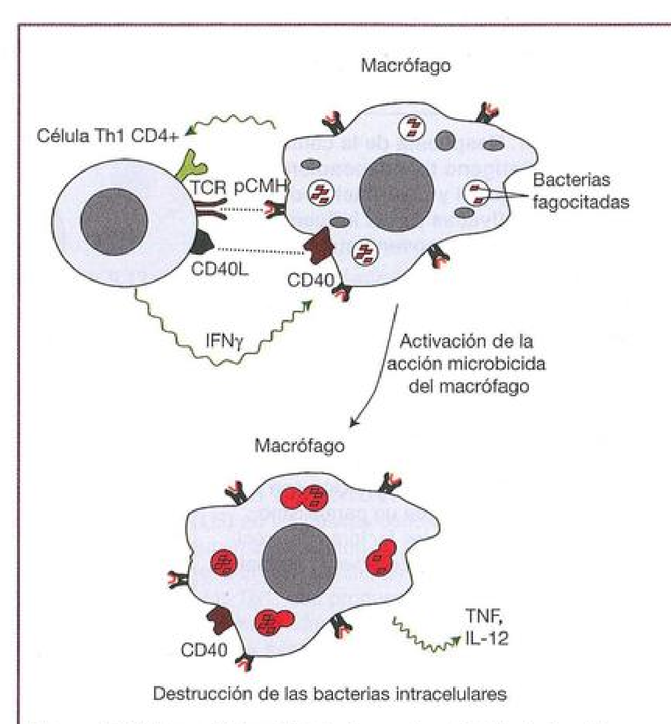


Figura 9.10. Las células Th1 inducen la actividad microbicida de los macrófagos.

El IFNγ proveniente de las células Th1 es importante para la activación de los macrófagos y puede incrementar la actividad microbicida de estas células para matar a las bacterias fagocitadas. El IFNγ también puede inducir la secreción de IL-12 y TNF por los macrófagos, como se muestra.

citocinas que expresan estas células. Como señalamos antes, el patrón particular de citocinas secretado por una célula T activada está influenciado por la naturaleza de las citocinas que se exponen tras el encuentro inicial con el antígeno presentado por una célula dendrítica madura dentro de los órganos linfoides secundarios. De un modo similar, el patrón de citocinas expresado por las células dendríticas está determinado por la naturaleza de los patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP) que induce la maduración de esta célula, así como el entorno de citocinas que prevalece durante el encuentro inicial con el agente infeccioso. Volviendo nuestra atención a la célula T, la **polarización** (es decir, la diferenciación ulterior a una subpoblación particular de Th) de estas células puede ser reforzada aún más por las señales de citocinas que se encuentran tras la circulación de células T sensibilizadas hacia el sitio de infección. De este modo, las respuestas de células T pueden adaptarse a la naturaleza del patógeno que indujo en primer lugar la activación del sistema inmunitario. Sin embargo, antes de analizar más los detalles de la polarización de las células T, **debemos advertir al lector que no considere este proceso como estrictamente limitado**, sino más bien como un continuo de respuestas que pueden mostrar patrones especialmente distintos en puntos específicos dentro del espectro.

Polarización celular

Los clones de células T *helper* pueden dividirse en tres subpoblaciones principales, Th1, Th2 y Th17, en las que cada una muestra perfiles distintos de secreción de citocinas (Figura 9.9), que a su vez influyen en el espectro de funciones efectoras llevadas a cabo por cada subpoblación. También se identificó otra subpoblación de células T CD4 positivas que ejerce control sobre las otras subpoblaciones de células T mediante la inhibición de su función efectora; estas células se denominan células T reguladoras o Treg. Consideremos algunas de las propiedades que estos perfiles de citocinas confieren a cada subpoblación de células T.

Las células Th1 coordinan respuestas contra patógenos intracelulares

Las células Th1 secretan perfiles de citocina orientados a coordinar respuestas contra **infecciones bacterianas y virales intracelulares** (Figura 9.9). Esto se logra en gran medida a través de la activación de macrófagos y la colaboración en la expansión de linfocitos T citotóxicos (Tc). Como ellos producen cantidades elevadas de IFNγ, las células Th1 son expertas en activar los macrófagos, que es particularmente importante cuando los macrófagos se han infectado por bacterias intracelulares que antagonizan activamente la función del macrófago. Cuando al sitio de infección arriba una célula efectora polarizada a Th1, puede ser reestimulada por macrófagos locales que están infectados por bacterias intracelulares o que tienen fragmentos bacterianos internalizados. La presentación de un antígeno específico mediante las moléculas de clase II del CMH en el macrófago conduce a la secreción dirigida de IFNγ por la célula Th1 contra el macrófago (Figura 9.10). Sin embargo, ante la ausencia de otras señales, los macrófagos no son muy sensibles al IFNγ. Este problema también lo resuelve la célula Th1 en la

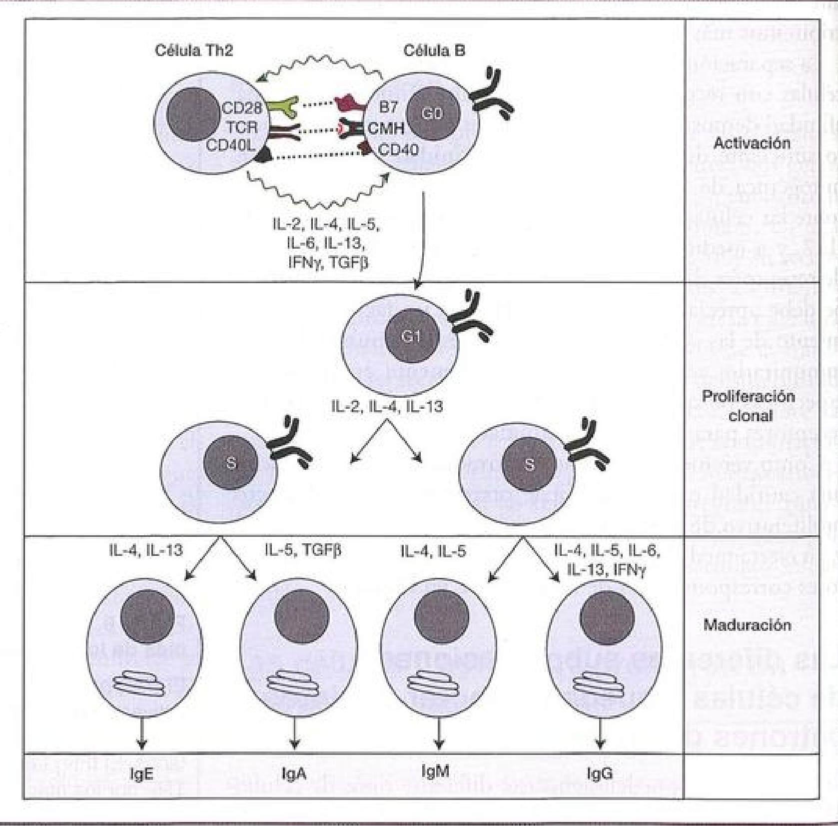


Figura 9.11. Respuesta de la célula B contra el antígeno timodependiente: expansión clonal y maduración de las células B activadas por la influencia de factores solubles provenientes de la célula T.

La coestimulación a través de la interacción CD40L-CD40 es esencial para las respuestas inmunitarias primaria y secundaria contra antígenos timodependientes como también para la formación de centros germinativos y células de memoria. La expresión de *c-myc*, que es máxima 2 horas después de la estimulación con el antígeno o anti-μ, sigue un paralelismo con la sensibilidad a los factores de crecimiento; la transfección con *c-myc* reemplaza a anti-μ.

forma de CD40L, que ocupa el CD40 en el macrófago y aumenta mucho su sensibilidad al IFNγ. Asimismo, las células Th1 pueden aumentar las funciones microbicidas del macrófago contra las bacterias extracelulares que son endocitados por fagocitosis (Figura 9.10). Recuérdese del Capítulo 1 que los macrófagos aumentan sus propiedades microbicidas tras la activación, y el IFNγ así como el TNFγ es una manera muy buena de lograr esto. Los macrófagos estimulados por el IFNγ también producen IL-12, que conduce al refuerzo del fenotipo Th1.

Las células Th1 también segregan concentraciones elevadas de IL-2 (Figura 9.9), que es capaz de sostener la expansión de las células T citotóxicas CD8 positivas, asesinas profesionales de células infectadas por virus; más adelante en este capítulo describiremos cómo producen la muerte. Esto puede suceder cuando las células T migran hacia el sitio de infección y una célula Th1 ataca un macrófago infectado o una célula dendrítica (por medio de interacciones entre el péptido/moléculas de clase II del CMH-TCR) en forma simultánea con un LTC, que se relaciona con la CPA por medio de interacciones péptido/moléculas de clase I del CMH-TCR. Esto crea las circunstancias en las que un LTC puede ser inducido a expandirse en forma clonal para aumentar sus números por la IL-2 producida por la célula Th1. Veremos después en este capítulo que una célula T1 también puede "autorizar" a una células dendríticas para que estimule a una célula Tc después que se haya apartado la célula Th1.

Otras citocinas secretadas por las células Th1, como IL-3 y GM-CSF, tienen efectos más distantes sobre los precursores de la médula ósea e inducen la producción de neutrófilos y macrófagos para aumentar las filas de estas células, como se necesita durante una infección en curso.

Las células Th2 coordinan la respuesta contra los patógenos extracelulares

Debido a su capacidad de generar IL-4, IL-5 e IL-13 (Figura 9.9), las cuales ayudan a la proliferación de las células B, el cambio de clase y la diferenciación de los efectores de diferenciación (Figura 9.11), las células Th2 son muy buenas colaboradoras de las células B y parece que están adaptadas para la defensa contra parásitos y otros patógenos extracelulares que son vulnerables a la IgE activada por IL-4, a la eosinofilia inducida por la IL-5 y a la proliferación de las células cebadas estimulada por IL-3 e IL-4. Al igual que las células Th1, las Th2 también producen IL-3 y GM-CSF para inducir la producción de neutrófilos y macrófagos desde los precursores medulares. La IL-5 también actúa a distancia, y es particularmente importante para la producción de eosinófilos (Figura 9.1), que, como vimos en el Capítulo 1, están particularmente bien adaptados para combatir los parásitos extracelulares grandes como los helmintos. Debido a su tamaño, estos agentes infecciosos no pueden ser inmediatamente fagocitados por los macrófagos o los neutrófilos. Para luchar contra este problema, los eosinófilos están equipados con gránulos especializados que contienen una cantidad de moléculas citolíticas que son liberadas en la superficie mediante los receptores de C3d de los eosinófilos con los parásitos opsonizados por C3b.

Las células Th17 favorecen las respuestas inflamatorias agudas y reclutan neutrófilos

Una incorporación relativamente reciente al redil de células T *helper*, las células Th17 están recibiendo en la actualidad considerable atención por su propensión a participar en reacciones autoinmunitarias cuando las acciones de estas células salen de control. Las células Th17 producen IL-17A y también secretan IL-17F, IL-21 e IL-22 (Figura 9.9). Estas células parecen estar especializadas en montar respuestas inflamatorias masivas contra **infecciones extracelulares bacterianas y micóticas**, sobre todo en las interfaces de las mucosas. Esto parece lograrse a través de la producción de IL-17A, IL-17F e IL-22, que tienen amplios efectos sobre muchos tipos celulares no inmunitarios, como células endoteliales y epiteliales, e inducir la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias por estas células para favorecer el reclutamiento de neutrófilos en el sitio de inflamación. Estas citocinas también inducen la secreción de péptidos antimicrobianos, por los queratinocitos por ejemplo, que fortalecen su función de barrera contra la infección.

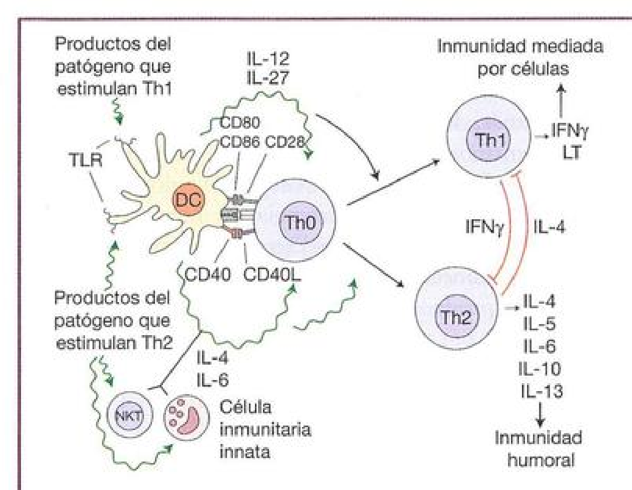


Figura 9.12. Generación de las subpoblaciones de CD4 Th1 y Th2.

Tras la estimulación inicial de las células T, surge una gama de células que producen un espectro de patrones de citocinas. De acuerdo con la naturaleza del patógeno y la respuesta de células del sistema inmunitario innato durante las fases iniciales de la infección, la población resultante de células T *helper* puede desviarse hacia dos extremos. Los productos del patógeno que estimulan Th1 (como LPS) ocupan los receptores de tipo Toll (TLR) en las células dendríticas (DC) o en los macrófagos e inducen la secreción de citocinas que polarizan Th1, como IL-12 e IL-27. Estas últimas citocinas estimulan el desarrollo de células Th1, que producen las citocinas características de la *inmunidad mediada por células*. La IL-4, producida tal vez por la interacción de microorganismos con el receptor tipo lectina NK1.1+ en las células NKT o a través de la interacción de los productos del patógeno-Th2 con los TLR sobre las células dendríticas DC, desvía el desarrollo hacia la producción de células Th2, cuyas citocinas ayudan a la progresión de las células B para la secreción de anticuerpos y a la provisión de la *inmunidad humoral*. Las citocinas producidas por subpoblaciones Th1 y Th2 polarizadas son mutuamente inhibidoras. LT, linfotoxina (TNFβ; Th0, célula T *helper* temprana que produce un espectro de citocinas; las otras abreviaturas son iguales a las del Cuadro 9.1.

Regulación cruzada de las subpoblaciones Th1, Th2 y Th17

Las citocinas particulares secretadas por las células Th1, Th2 y Th17 no sólo las posibilita para provocar distintas funciones biológicas; estas citocinas también ayuda a reforzar el mismo patrón de producción de citocina, así como inhibir la polarización a la subpoblación alternativa de Th, una característica que a veces es aprovechada por ciertos patógenos para su beneficio. La capacidad del IFNγ la citocina Th1 característica) de inhibir la proliferación de clones Th2, y de la IL-4 y la IL-10 derivadas de Th2 para bloquear tanto la proliferación como la liberación de citocinas por las células Th1, parece poner la cuestión más allá de cualquier duda razonable (Figura 9.12). Del mismo modo, el desarrollo del fenotipo Th1 o Th2 parece ser antagónico al desarrollo de las células Th17.

Los estudios acerca de la infección de ratones por el protozoo patógeno *Leishmania major* demostraron que la inyección intravenosa o intraperitoneal de promastigotos muertos conduce a la protección contra el desafío con parásitos vivos asociada con una alta expresión de mRNA de IFNγ y bajos niveles de mRNA de IL-4; el hallazgo recíproco de una baja expresión de IFNγ y alta de IL-4 se realizó después de la inmunización subcutánea que no suministró protección. Además, los ratones no vacunados infectados por microorganismos vivos pudieron recuperarse mediante la inyección de IFNγ y anti-IL-4. Estos resultados son compatibles con la expansión preferencial de una población de células protectoras Th1 que secretan IFNγ por inmunización intraperitoneal o intravenosa, y de células Th2 no protectoras que producen IL-4 en los animales que recibieron la inoculación por vía subcutánea.

Estabilidad versus plasticidad de subpoblaciones Th

La clasificación original de Mossman-Coffman en subpoblaciones Th1 y Th2 se fundó en los datos obtenidos con clones que habían sido mantenidos en cultivo durante períodos prolongados y podrían haber sido artificios de las condiciones *in vitro*. El uso de anticuerpos monoclonales específicos contra citocinas para la tinción fluorescente intracelular, y de ensayos ELISPOT para la detección de las moléculas secretadas, demostró que los fenotipos Th1 y Th2 también se evidencian en muestras de células recién obtenidas y, por lo tanto, también es aplicable *in vivo*. No obstante, tal vez sea mejor no estar tan rígidamente limitado en el pensamiento por el paradigma Th1/Th2/Th17, sino considerar a las células T activadas como potencialmente productoras de un espectro completo de perfiles de citocinas (Th0; Figura 9.12), con una posible desviación de las respuestas hacia patrones particulares según la naturaleza del estímulo antigénico. Por lo tanto, también pueden existir otras subpoblaciones, en particular las células productoras del factor transformador del crecimiento β (TGFγ) y las células Th3/Tr1 (T reguladoras 1) productoras de IL-10, las cuales son de interés porque estas citocinas pueden mediar los efectos inmunosupresores y participar en la inducción de la tolerancia inducida en las mucosas. Otra subpoblación que también surge en la bibliografía científica es una clase de células Th que se denominaron **células T helper foliculares (Tfh)** que parecen ser importantes para guiar el desarrollo de la célula B, el cambio de clase y la supervivencia dentro de los centros germinativos. Se determinó que las células Tfh producen concentraciones elevadas de IL-21 y migran a las regiones foliculares tras la activación para formar contactos estables con las células B cebadas con el antígeno.

Es muy probable que en los años venideros se identifiquen más subpoblaciones de células T; la evidencia actual sugiere que en lugar de que cada subpoblación represente "linajes" de células T altamente comisionadas y separadas, parece que hay considerable plasticidad en el espectro de citocinas que pueden segregar células T diferenciadas. Además, es también evidente que **puede producirse la reprogramación de las células T efectoras,** que convierte las subpoblaciones de células T diferenciadas de un tipo hacia otro.

Las células del sistema inmunitario innato determinan la respuesta Th1/Th2/Th17

Ya hemos presentado el concepto de que el medio de citocinas establecido por las células del sistema inmunitario innato durante las etapas tempranas de la infección tiene una influencia muy importante en la respuesta inmunitaria adaptativa (Figura 9.2 y 9.12). En las etapas iniciales de una infección, la respuesta inmunitaria innata que mantiene la línea como linfocitos T requiere el cebado por las células dendríticas para iniciar la maduración y la expansión clonal a células efectoras. Tras la migración de las células T específicas para el antígeno a los ganglios linfáticos, donde entran en contacto con las células dendríticas maduras que recién se enfrentaron con los patógenos microbianos, los productos del patógeno encontrados por la célula dendrítica habrán polarizado a éstas para secretar citocinas particulares, como describimos antes (Figura 9.9). La polarización de las células T hacia una Th1, Th2 u otro destino se logra a través de señal 3 y la naturaleza de esta señal está fuertemente influenciada por las condiciones en que se produjo el cebado de la CPA (Figura 9.12).

Polarización Th1

La IL-12 y sus moléculas relacionadas recientemente descubiertas, IL-23 e IL-27, son fundamentales en la polarización hacia el fenotipo celular Th1 (Figura 9.12). La invasión de células fagocíticas por patógenos intracelulares induce la secreción copiosa de IL-12, la que a su vez estimula la producción de IFNγ por las células NK. La ocupación de muchos de los receptores conocidos de tipo Toll (TLR) sobre las células dendríticas por productos microbianos (como LPS, dsRNA y DNA bacteriano) desencadena la maduración de las células dendríticas e induce la producción de IL-12, lo cual favorece las respuestas de Th1. La estimulación bacteriana también induce la expresión del receptor CD40 sobre las células dendríticas y la sensibilidad a CD40L, expresado por las células T activadas, para la síntesis óptima de IL-12. Esta interleucina

también es particularmente eficaz para inducir IFNγ por las células T activadas, y la secreción de IFNγ por las células T refuerza aún más la producción y la secreción de IL-12 por las células dendríticas; esto actúa como un circuito de retroalimentación positivo clásico para aumentar la producción de IL-12 y desviar más la respuesta hacia Th1.

Polarización Th2

La IL-4 es dominante para la producción de una célula con fenotipo Th2. Mientras que la IL-12 y el IFNγ favorecen la respuesta Th1, estas citocinas también inhiben las respuestas Th2 responses (Figura 9.12). Sin embargo, los efectos de IL-4 parecen ser dominantes sobre IL-12 y, por lo tanto, las cantidades de IL-4 en relación con las cantidades de IL-12 e IFNγ serán de suma importancia para determinar la diferenciación de células Th0 (es decir, no polarizadas) en Th1 o Th2. La IL-4 inhibe la expresión de la subunidad β_2 del IL-12R necesario para la respuesta frente a la IL-12, lo cual polariza aún más la preponderancia de Th2. Todavía es incierto si las señales del sistema inmunitario innato impulsan las células T en la dirección de una respuesta de Th2 o si ésta es una vía de diferenciación predefinida para las células Th a menos que se suprima por señales polarizantes Th1, como IL-12 o IFNγ. Una población de células especiales, las NKT que contienen el marcador $NK1.1^+$, con la estimulación liberan rápidamente un patrón de citocinas dominadas por IL-4. Estas células tienen muchas características inusuales. Pueden ser $CD4^-8^-$ o $CD4^+8^-$ y expresan niveles bajos de receptores αβ de células T con una cadena α invariable y una β muy restringida; y muchos de estos receptores reconocen la molécula CD1 similar a la molécula no clásica del CMH. Su morfología y el contenido de sus gránulos son intermedios entre las células T y las NK. Aunque expresan TCR αβ, existe una tendencia a clasificarlas en la franja del sistema inmunitario "innato" en relación con sus características primitivas y la presencia del receptor similar a la lectina NK1.1, que puede estar implicado con el reconocimiento de los hidratos de carbono microbianos.

Polarización Th17

Si bien la mezcla precisa de citocinas que activa la producción de células Th17 es aún un tema de debate activo, está claro que la citocina proinflamatoria IL-6 desempeña un papel particularmente influyente al comienzo. Esto es reforzado por IL-23, que parece ser importante para la expansión y la estabilización de estas células (Figura 9.9). Las células T vírgenes no expresan receptores IL-23, pero los sobreexpresan tras la activación productiva, que también están aumentados por la IL-6. Así, la función de IL-23 en la diferenciación hacia las células Th17 es la de refuerzo más que la de iniciación. También existe evidencia que el TGFβ en combinación con la IL-6 influye en la generación de células Th17, mientras que TGFβ sólo polariza las células T hacia un destino de Treg, como describiremos a continuación. Sin embargo, TGFβ parece desempeñar un papel instructivo para la producción de células Th17, por el contrario, parece suprimir el desarrollo de fenotipos Th2 o Th1, que son antagónicos para el destino de Th17.

Otras consideraciones sobre la polarización Th

Mientras que hay ciertas pruebas que indican la existencia de subpoblaciones de células dendríticas especializadas para la de estimulación de poblaciones Th1 o Th2, parece que las células dendríticas son relativamente plásticas y puede adoptar un fenotipo de polarización Th1, Th2 o Th17 dependiendo de las señales de cebado que encuentran en fuentes microbianas y derivadas del tejido. Sin embargo, por el comentario anterior debería ser evidente que las citocinas producidas en las inmediaciones de la célula T van a ser importantes.

Control del sistema inmunitario adaptativo

Además de las subpoblaciones de células T efectoras que describimos, hay muchas pruebas que indican que las células T también se diferencian en células que ejercen una función **supresora o reguladora** en las respuestas inmunitarias (Figura 9.9). Es decir, estas células parecen controlar las acciones de las otras clases de células T, interviniendo para aplacar las respuestas inmunitarias cuando parece ser necesario. Estas células se denominan células T reguladoras, o Treg, de las que hay dos categorías diferentes: Treg *naturales* e *inducibles*. Estas células suprimen las respuestas contra antígenos propios, así como las respuestas inapropiadas o indeseables contra antígenos no propios (como bacterias comensales o alimentos en el intestino); en realidad, en la actualidad se considera que las Treg controlan casi todas las respuestas inmunitarias adaptativas. En primer lugar describiremos a las Treg naturales, ya que parecen constituir el tipo más abundante.

Células T reguladoras (Treg) naturales

Las Treg derivadas del timo o naturales son una población de células T $Foxp3^+CD25^+CD4^+$ que pueden suprimir respuestas inmunitarias de células T autorreactivas por mecanismos que aún no se conocen bien, pero en las cuales parecen intervenir varias estrategias y tal vez superpuestas (véase a continuación). El concepto actual es que estas células T reactivas frente a antígenos propios se desarrollan en el timo y se liberan como células funcionalmente maduras, que pueden suprimir la activación de otras células T que reaccionan contra lo propio y escapan a la selección negativa en el timo, posiblemente a través de la competición por antígenos propios presentados por las CPA, o a través de las señales mediadas por CTLA4 provenientes de la Treg a la CPA.

Las Treg naturales constituyen del 5 al 10% de las células T CD4 positivas y su desarrollo depende fundamentalmente de la inducción de Foxp3, un factor de transcripción que puede reprimir la transcripción de las citocinas de los tipos Th1, Th2 y Th17. Las mutaciones de pérdida de la función en el gen *FOXP3* dan por resultado varios trastornos inflamatorios y autoinmunitarios caracterizados por la producción masiva de citocinas de tipos Th1 y Th2, que por último resulta mortal. Las Treg parecen ser esenciales para la supresión de las células T autorreactivas, ya que su depleción da por resultado el desarrollo espontáneo de enfermedad

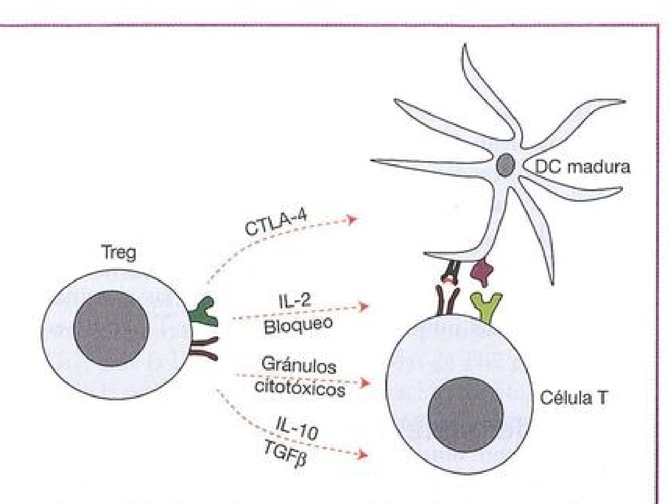


Figura 9.13. Mecanismos alternativos de la supresión mediada por células T reguladoras.

Las células T reguladoras (Treg) pueden ejercer sus funciones reguladoras sobre las células T a través de la secreción de citocinas inmunosupresoras, enzimas citotóxicas o efectos dependientes del contacto celular CTLA-4. Estos efectos pueden actuar sobre la célula T que lleva a cabo la regulación o sobre las células dendríticas (DC) u otras células presentadoras de antígeno (APC) que presentan el antígeno a las células T vírgenes. Véase el texto para más detalles.

autoinmunitaria en ratones normales en otros aspectos. En los seres humanos, la situación equivalente como consecuencia de mutaciones en el gen que codifica Foxp3 se conoce como trastorno de la regulación inmunitaria, poliendocrinopatía, enteropatía, ligada al X (IPEX por sus siglas en inglés). La enfermedad autoinmunitaria también puede ser provocada por transferencia adoptiva de esplenocitos sin Treg proveniente de ratones adultos normales a receptores singénicos que carecen de células T. La estimulación *in vitro* de células deplecionadas de Treg Foxp3$^+$ provenientes de sangre periférica de individuos sanos reveló que las células T reactivas hacia varios antígenos propios están con frecuencia presentes, pero la proliferación de estas células T autorreactivas puede suprimirse con facilidad mediante el agregado de nuevo de Tregs. Estos experimentos sugieren que es probable que las células T autorreactivas, que no son anérgicas, existan en todos los individuos. Por lo tanto, las Treg probablemente existen para contrarrestar las acciones de estas células y para prevenir el desarrollo de la autoinmunidad espontánea.

La IL-2 también es crucial para el mantenimiento de las células Treg naturales dado que estas células T son incapaces de elaborar su propia IL-2, a diferencia de las células T activadas, y para su supervivencia se basan por completo en la IL-2 paracrina. En consecuencia, el número de estas células se reduce drásticamente en ratones con desactivación génica (*knockout*) de *IL-2* e *IL-2R*, con el resultado de que desarrollan linfoproliferación seguida de autoinmunidad que les causan la muerte. Está sin resolver cuál es el origen de la IL-2 para el mantenimiento de las Treg, pero podrían provenir de células T autorreactivas o activadas por el antígeno que interactúan con la misma célula dendrítica que la Treg.

Células T reguladoras (Treg) inducibles

Al contrario de las células Treg naturales, las Treg inducibles (o adaptativas; iTreg) se generan a partir de las células T vírgenes en la periferia después del encuentro con el antígeno presentada por las células dendríticas. Estas células T reguladoras constituyen un grupo diverso, a pesar de que aún no está claro si estas poblaciones de células Treg inducibles son verdaderamente diferentes.

Las **células Th3** representan una subpoblación de iTreg encontradas en las mucosas que secretan IL-4, IL-10 y TGFβ. Estas células parecen ser importantes para la tolerancia oral y por lo general pueden intervenir para mantener la tolerancia hacia microorganismos comensales beneficiosos que habitan nuestro tracto intestinal.

Las **células Tr1** se habían descrito tras la activación de células T ante concentraciones elevadas de IL-10 *in vitro*. Estas células secretan TGFβ y pueden ser inducidas por las células dendríticas inmaduras que presentan el antígeno sin ligandos coestimuladoras apropiados.

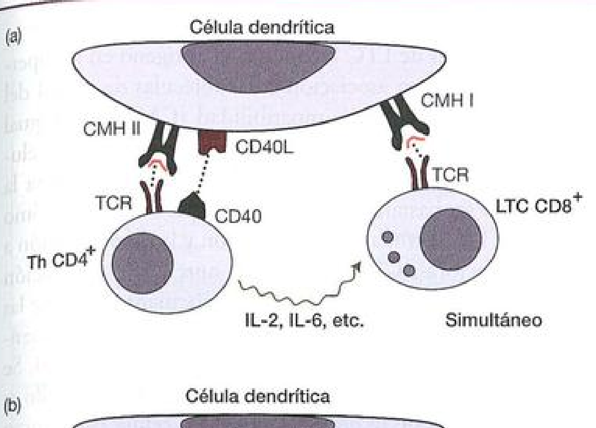
Las **Tregs inducibles por Foxp3$^+$** se habían descrito cuando la activación de TCR se produce ante la presencia de TGFβ e IL-2. La diferenciación de la célula iTreg Foxp3 también parece estar favorecida en entornos tisulares particulares; los tejidos linfoides asociados al intestino (GALT) son particularmente aptos para la generación de estas células.

Las células T reguladoras ejercen sus efectos a través de múltiples mecanismos

Se había comunicado que las Tregs ejercen sus efectos supresores por medio de varios mecanismos diferentes (Figura 9.13). Algunas Tregs parecen reprimir las respuestas de células T a través de la **producción de citocinas inmunosupresoras** como IL-10, TGFβ o IL-35. La IL-10 suprime las respuestas de células T al inhibir la producción de IL-2, IL-5 y TGFβ y también por la inhibición de la sobreexpresión de moléculas de clase II del CMH, así como de ligandos B7 coestimuladores en las células dendríticas y los macrófagos. Este último efecto tiene la consecuencia de antagonizar la presentación antigénica eficaz y coestimulación de células T. El TGFβ también bloquea la producción de citocinas por las células T, así como la citotoxicidad y la proliferación.

También se comunicó la **muerte de las CPA o de las células T efectoras** mediadas por Treg. En este caso, el reconocimiento del antígeno específico por una Treg precipita la reacción de muerte celular citotóxica en la que la Treg induce la apoptosis en la CPA que presenta el antígeno a la Treg o en una célula T cercana que se comunica con la misma CPA. La muerte en esta situación parece depender de la expresión de granzima B y perforina por la Treg. Más adelante en este capítulo analizaremos en detalle el mecanismo de la muerte mediado por granzima B/perforina.

La **competición por la IL-2** de las células T también se implicó como un mecanismo efector de las Treg, ya que estas células pueden utilizar la IL-2, pero no la elaboran. Al parecer, la estrategia aquí es que la Treg compite por la IL-2 elaborada por las células efectoras cercanas que, por lo tanto, reduce la expansión de células T activadas que tienen una



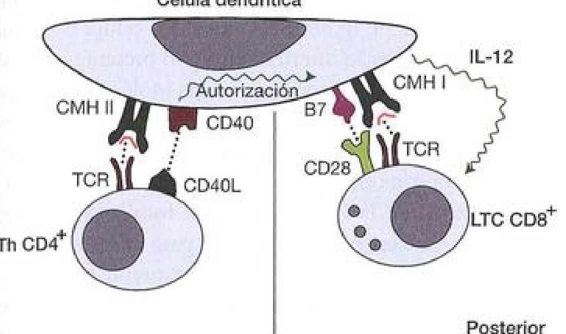


Figura 9.14. Activación de las células T citotóxicas por las células T *helper*.

La activación de las células T *helper* CD4+ (Th) por la célula dendrítica comprende una señal coestimuladora del CD40-ligando CD40 (CD154) y el reconocimiento de un péptido de clase II del CMH presentado por el receptor de la célula T. a) Cuando se presentan al mismo tiempo tanto la Th como el linfocito T citotóxico (Tc), la liberación de citocinas desde las células Th activadas estimula la diferenciación del precursor CD8+ en una célula Tc activada y está restringida por las moléculas de clase I del CMH. Sin embargo, tal como se muestra en b), las células Th y Tc no necesitan interactuar con la célula presentadora de antígenos al mismo tiempo. En este caso, la célula Th "autoriza" a la célula dendrítica para la interacción futura con una célula Tc. Por lo tanto, la célula Th, a través del CD40, impulsa a la célula dendrítica desde un estado de reposo a un estado activado con sobreexpresión de moléculas coestimuladoras como B7.1 y B7.2 (CD80 y CD86, respectivamente) y a una mayor producción de citocinas, sobre todo de IL-12.

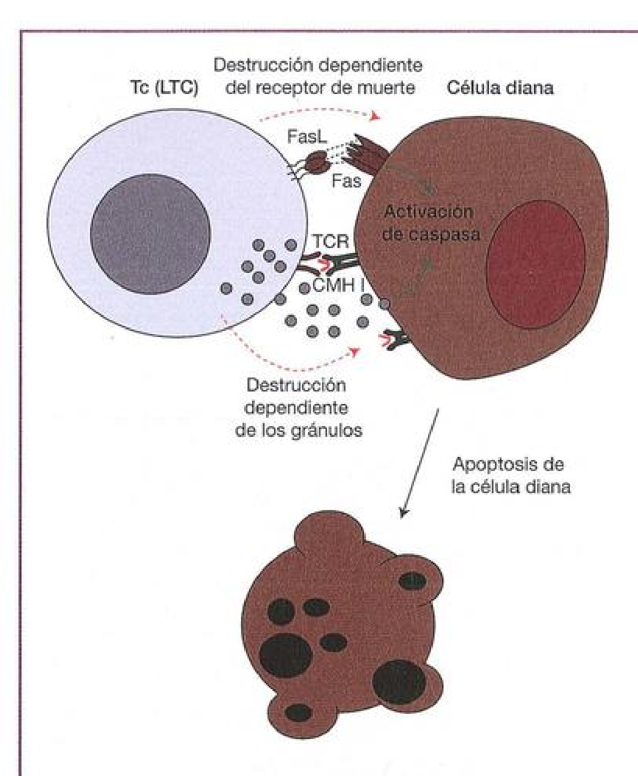


Figura 9.15. Las células T citotóxicas (Tc o LTC) pueden destruir a las células diana por medio de las vías dependiente de gránulos o dependiente del ligando Fas (FasL) hacia la apoptosis.

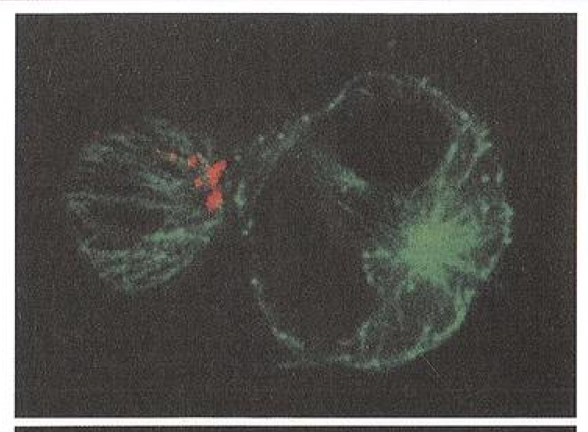
Ambas vías producen la activación de los miembros de la familia de proteasas caspasa dentro de la célula diana y estas enzimas destruyen la célula diana por la proteólisis de cientos de proteínas que actúan como sustrato. Véanse las Ffiguras 9.17 y 9.18 para obtener más información sobre el mecanismo de muerte celular por cualquier vía.

dependencia fundamental por esta citocina para la proliferación clonal (Figura 9.8).

Por último pero no menos importante, se ha informado sistemáticamente que el **CTLA-4**, el receptor alternativo para los ligandos coestimuladores B7, es importante para las funciones de Treg. Las Treg que presentan en su superficie CTLA-4 podrían ejercer efectos inhibidores en la activación de las células T por varios mecanismos. Una manera es la simple competición de las células T por los ligandos B7 en las CPA, otra es la provisión de señales negativas a las células dendríticas a través de CTLA-4, que inhiben los ligandos B7 (es decir, CD80 y CD86) en esta última, lo que deja a estas células sin la capacidad de activar de manera productiva a las células T vírgenes. De hecho, se ha observado que las Treg forman agregados alrededor de las células dendríticas y suprimen la sobreexpresión de ligandos B7; estas células también pueden inhibir la producción de citocina por las células dendríticas. Es importante destacar que la eliminación de CTLA-4 de Treg específicas trae como consecuencia el desarrollo espontáneo de linfoproliferación sistémica y enfermedad mortal en ratones.

Es probable que uno o más de los mecanismos mencionados operen en forma simultánea, dependiendo del contexto. Sin embargo, **un mecanismo básico que puede ser común a todas las Tregs parece operar a través de CTLA-4**, sobre todo respecto de las Treg naturales, ya que estas células expresan altos niveles de este receptor. En este aspecto, el bloqueo de CTLA-4 por anticuerpos monoclonales provoca enfermedad autoinmunitaria específica de órgano y enfermedad inflamatoria intestinal en animales sanos. Foxp3, junto con otros factores de transcripción, produce la sobreexpresión de CTLA-4 mediante efectos dependientes de promotor. Los ratones que carecen de *CTLA-4*, concretamente en Treg naturales, mueren por distintas enfermedades autoinmunitarias de una manera similar a los ratones deficientes del gen *FOXP3*.

Independientemente del mecanismo de acción preciso, todos los autores coinciden en que las Treg son de suma



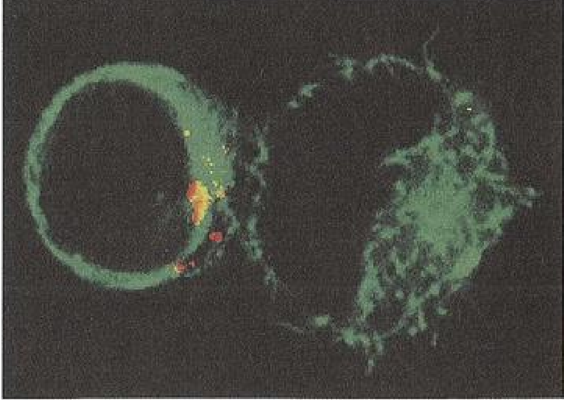


Figura 9.16. Conjugación de una célula T citotóxica (a la izquierda) con su célula diana; en este caso es un mastocitoma de ratón, que muestra la polarización de los gránulos hacia la célula diana en el punto de contacto. Los citoesqueletos de ambas células se ponen de manifiesto mediante tinción inmunofluorescente, con un anticuerpo contra la tubulina *(verde)*, y los gránulos líticos con un anticuerpo contra la granzima A *(rojo)*. Veinte minutos después de la conjugación el citoesqueleto de la célula diana aún puede estar intacto *(arriba)*, pero se altera con rapidez *(abajo)*. (Fotografías proporcionadas por gentileza del Dr. Gillian Griffiths.)

importancia para vigilar las actividades de células T potencialmente autorreactivas, así como para limitar las respuestas excesivas contra antígenos no propios. En consecuencia, el fracaso para montar respuestas eficaces de Treg con frecuencia produce enfermedad autoinmunitaria.

Las células T CD8+ efectoras en la inmunidad mediada por células

Las células T citotóxicas (Tc) CD8+, restringidas por moléculas de clase I del CMH, también se denominan linfocitos T citotóxicos (LTC), representan la otra rama muy importante de la respuesta de la inmunidad mediada por células; constituyen una estrategia muy importante en la muerte de las células infectadas por virus y también contribuyen a los mecanismos de vigilancia contra el cáncer. Mientras que algunas células T CD4+ son capaces de la muerte citotóxica, la mayoría de las muertes causadas por los LTC proviene de la población de células T CD8+.

Generación de células T citotóxicas

Los precursores de LTC reconocen el antígeno en la superficie de las células en asociación con moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y, al igual que las células B, suelen necesitar la colaboración de las células T. Sin embargo, el mecanismo por el cual se expresa la ayuda puede ser bastante diferente en lo que se refiere a cómo las células Th2 estimulan la proliferación y la diferenciación a células B efectoras. Como se explicó antes, la colaboración eficaz entre las células T y B suele ser "vinculante", ya que las células colaboradoras reconocen dos epítopos que físicamente están unidos (por lo general, sobre la misma molécula). Se debe recordar al lector, sin ofenderlo, que la razón para ello es que los receptores de Ig de superficie de la célula B capturan el antígeno, lo procesan internamente y lo presentan a la célula Th como un péptido asociado con las moléculas de clase II del CMH. Si bien se demostró que los epítopos ligados en el antígeno también son necesarios para la cooperación entre Th y el precursor de la célula T citotóxica (Tcp), la naturaleza del reconocimiento de la célula T impide focalizar el antígeno nativo sobre el Tcp por su receptor para el procesamiento ulterior, aun cuando esa célula fuera a expresar moléculas de clase II del CMH, algo que no hace en su estado de reposo. Parece más probable que la Th y el Tcp se unen a la misma CPA, por ejemplo una célula dendrítica, que ha procesado el antígeno viral y expone péptidos virales procesados asociados tanto con las moléculas de clase II (para la célula Th) como con las de clase I (para el Tcp) en su superficie; no se puede descartar la posibilidad de que la CPA pueda ser la misma célula infectada por el virus. Las citocinas que provienen de la Th activada serán liberadas en las proximidades del Tcp, que recibe la señal antígeno-CMH y será estimulado a proliferar y diferenciarse en una Tc bajo la influencia de IL-2 e IL-6 (Figura 9.14a). Sin embargo, la interacción de la CPA con la célula Th y con la célula Tc puede separarse en forma temporaria y, en este caso, parecería que la célula T *helper* "autoriza" a la célula dendrítica a interactuar en el futuro con la célula T citotóxica. Esto lo hace mediante la activación de las células dendríticas a través de CD40, con lo cual estas células sobreexpresan moléculas coestimuladoras y aumentan la producción de citocinas, en particular, IL-12 (Figura 9.14b). También se cree que hay un mecanismo para la activación de Tc totalmente independiente de la célula Th. Esto se demostró, por ejemplo, en la respuesta a antígenos proteicos administrados con adyuvantes potentes como las secuencias de DNA inmunoestimuladoras (ISS, *immunostimulatory DNA sequences*), y en este caso posiblemente involucre la producción de citocinas proinflamatorias inducidas por el adyuvante y de moléculas coestimuladoras de la superficie celular.

El proceso letal

Como se señaló, las células T citotóxicas suelen ser de la subpoblación CD8 y su unión a la célula diana a través del reconocimiento de péptido presentado por las moléculas de clase I del CMH mediado por TCR es ayudada por interacciones entre CD8, el correceptor para la clase I, y por otras moléculas accesorias como LFA-1 y CD2 que aumentan la afinidad de la interacción entre el LTC y la célula diana (véase la Figura 8.3).

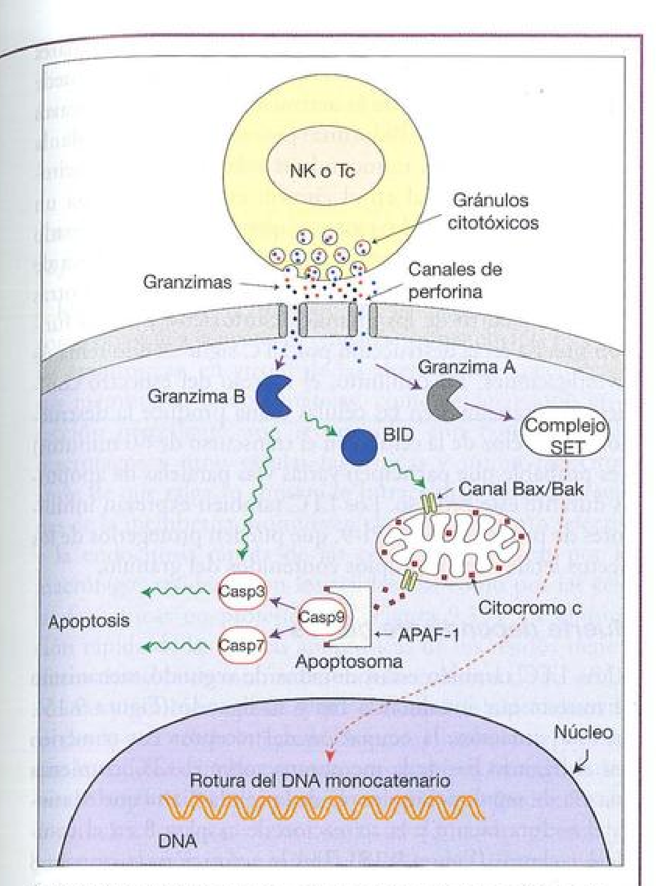


Figura 9.17. Muerte de las células diana por las células T citotóxicas y NK dependiente de gránulos citotóxicos.

En respuesta a un estímulo apropiado, las células Tc y NK liberan los contenidos de sus gránulos citotóxicos sobre la superficie de las células diana. Se considera que la proteína perforina del gránulo citotóxico se polimeriza dentro de la membrana de la célula diana formando poros que permiten el pasaje de otros constituyentes del gránulo, como diversas serinproteasas (granzimas), a su interior. Una vez que ingresa en la célula diana, la granzima B orquesta la apoptosis mediante la escisión y la activación de BID, la cual se transloca a las mitocondrias y activa la apertura de un poro o canal dentro de la membrana externa mitocondrial compuesta por Bax, Bak o ambas; este último canal permite la liberación del citocromo *c* desde el espacio intermembranoso mitocondrial al interior del citoplasma, donde actúa como un cofactor para el ensamble de un complejo activador de la caspasa-9 (apoptosoma). El apoptosoma estimula la activación en cadena de las caspasas, como la caspasa-3 y la caspasa-7, y estas proteasas coordinan la apoptosis a través de la proteólisis restringida de cientos de proteínas que actúan como sustrato. La granzima B también puede procesar y activar de manera proteolítica y directa la caspasa-3 y la caspasa-7, que proporciona una vía más directa para la activación de la caspasa. Otra proteína del gránulo, la granzima A, puede escindir una proteína dentro del complejo SET (un complejo proteico asociado con el retículo endoplasmático). Esto permite la translocación de una nucleasa (NM23-H1) al compartimiento nuclear que puede catalizar las roturas del DNA monocatenario. Los gránulos citotóxicos también contienen otras granzimas que contribuyen a la destrucción de la célula diana, pero aún no se han identificado los sustratos para estas proteasas.

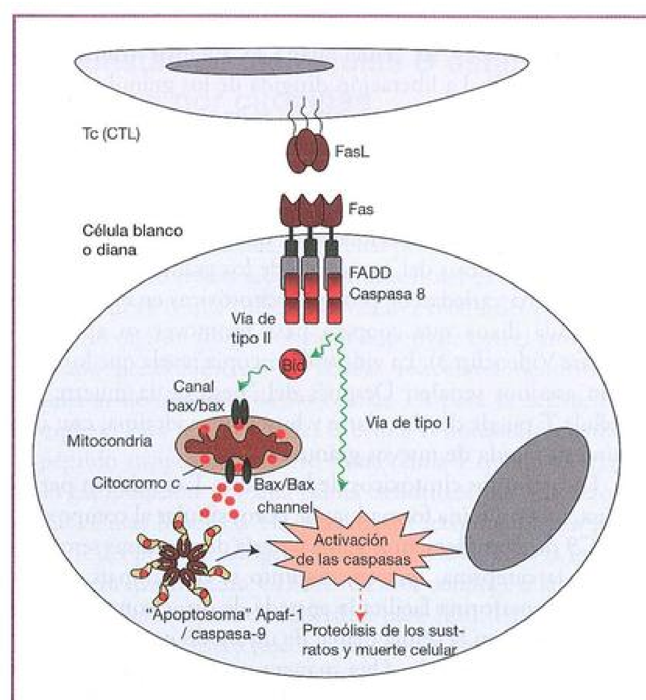


Figura 9.18. Vía Fas-ligando Fas (FasL) hacia la apoptosis.

Tras el encuentro de una célula que posee el ligando Fas (FasL), las células susceptibles sufren apoptosis a través del reclutamiento de la caspasa 8 en la cola citoplasmática del receptor Fas, por medio de la proteína adaptadora FADD. El reclutamiento de la caspasa 8 al complejo receptor produce la activación de esta proteasa, que entonces puede amplificar en sentido anterógrado la activación de caspasa, ya sea en forma directa (vía de tipo I) o indirecta mediante la escisión de Bid y provoca la liberación de citocromo *c* a partir de la mitocondria (vía de tipo II) que activa el "apoptosoma" Apaf-1 / caspasa-9. A continuación, el apoptosoma estimula la activación de las caspasas efectoras que matan a la célula (véase la Figura 1.25).

Tras el reconocimiento de una célula diana adecuada, los LTC pueden destruirla por medio de dos mecanismos distintos; la **vía Fas/ligando Fas** y la **vía perforina/granzima**, que no son mutuamente excluyentes ya que ambas opciones para causar la muerte pueden estar disponibles en un LTC individual (Figura 9.15). Ambos mecanismos de muerte culminan en la activación de una familia de proteasas citotóxicas, conocidas como caspasas, dentro de la célula diana que coordinan el proceso desde el interior; la única diferencia entre los dos mecanismos es el modo en que se activan las caspasas. La comparación de células T que carecen de Fas ligando funcional así como de perforina, con células T que carecen de perforina sola demostró que estos dos mecanismos determinan la mayoría de la actividad destructiva de los LTC (así como de las células NK), mientras que el TNF representa un componente menor de destrucción por los LTC. Nos referiremos primero a los mecanismos de destrucción por perforina/granzima y después al dependiente de Fas.

Muerte dependiente de perforina/granzima

Los LTC contienen lisosomas modificados provistos de una batería de proteínas citotóxicas, denominados en conjunto como **gránulos citotóxicos**. Tras la activación de los LTC, los gránulos citotóxicos son impulsados a una velocidad poco común (de hasta 1,2 µm/seg) a lo largo del siste-

ma de microtúbulos y liberados en el punto de contacto entre el LTC y su célula diana la **sinapsis inmunitaria** (Figura 9.16). La liberación dirigida de los gránulos citotóxicos hacia la sinapsis inmunitaria es importante porque asegura la especificidad de muerte impuesta por el reconocimiento de TCR de la célula diana y limita los daños colaterales a las células circundantes y a la propia célula asesina. Como sucede con las células NK, que tienen gránulos similares, la exocitosis del contenido de los gránulos citotóxicos provee una variedad de proteínas citotóxicas en el citosol de la célula diana que coopera para promover su apoptosis (véase Videoclip 3). La videomicroscopia revela que los LTC son asesinos seriales. Después del "beso de la muerte", la célula T puede desvincularse y buscar otra víctima, con una síntesis rápida de nuevos gránulos.

Los gránulos citotóxicos de las células T contienen **perforina**, una proteína formadora de poros similar al componente C9 del complemento, y una batería de proteasas semejantes a la catepsina, que en conjunto se denominan **granzimas**. La perforina facilita la entrada de otros constituyentes del gránulo en la célula diana, de un modo que aún es tema de gran controversia. Una manera por la cual la perforina puede proporcionar granzimas al interior de la célula diana es a través de la oligomerización en un poro de la membrana citoplasmática de la célula diana que, por consiguiente, permite el acceso de las granzimas al citosol (Figura 9.17). En realidad, pueden formarse poros de hasta 20 nm de diámetro dentro de las membranas lipídicas mediante el empleo de perforina purificada. Un mecanismo alternativo propuesto implica la endocitosis de los gránulos citotóxicos por la célula diana, en el que la perforina facilita el escape de las granzimas desde los endosomas al interior del citosol de la célula diana. Independientemente del modo preciso por el cual actúe la perforina, está claro que esta proteína formadora de poro desempeña una función esencial en el proceso de destrucción; los ratones deficientes en perforina son intensamente comprometidos en la eliminación de varios patógenos virales. En los seres humanos, la deficiencia congénita de perforina produce un trastorno inmunorregulador potencialmente mortal, la linfohistiocitosis hemofagocítica familiar (FHL) de tipo 2, que se caracteriza por hiperractivación de células T y macrófagos que infiltran los tejidos y causan daño extenso debido a la producción excesiva de citocinas inflamatorias. Los síntomas de esto último también apuntan hacia una función para la vía perforina/granzima en un contexto inmunorregulador, como mencionamos antes en el análisis del mecanismo de acción de las Treg (Figura 9.13).

No está claro cómo contribuyen todas las granzimas a la muerte de la célula diana tras la liberación en el interior del citoplasma celular, pero se sabe que las granzimas A y B desempañan funciones particularmente importantes en este proceso. La granzima A puede estimular la activación de una nucleasa a través de la proteólisis de su inhibidor y esto da lugar a la formación de numerosas interrupciones en el DNA monocatenario dentro de la célula diana (Figura 9.17). La granzima B puede procesar directamente y activar varios miembros de la familia **caspasa** de las cisteinproteasas, que estarán en condiciones de comenzar con rapidez la apoptosis a través de la proteólisis restringida de centenares de proteínas dentro de la célula diana. Asimismo, puede promover indirectamente la activación de caspasa, a través de la activación de Bid, una proteína que estimula la permeabilidad de las mitocondrias y la liberación de citocromo *c* mitocondrial en el citosol; esto último arma un complejo activador de caspasa que se ha denominado "apoptosoma" y que promueve la activación en cadena de varias caspasas (Figura 9.17). También se describieron otras granzimas dentro de los gránulos citotóxicos, pero su función precisa en la destrucción por LTC sigue siendo tema de investigaciones. En conjunto, el ingreso del espectro completo de granzimas en las células diana produce la destrucción muy veloz de la célula (en el transcurso de 60 minutos) y es probable que participen varias vías paralelas de apoptosis durante este proceso. Los LTC también expresan inhibidores de proteasa, como PI-9, que pueden protegerlos de los efectos letales de los propios contenidos del gránulo.

Muerte dependiente de Fas

Los LTC también están dotados de segundo mecanismo de muerte que involucra a Fas y su ligando (Figura 9.15). En esta situación, la ocupación del receptor Fas trimérico por el ligando Fas de la membrana sobre el LTC comienza una vía de señalización dentro de la célula diana que ocasiona el reclutamiento y la activación de caspasa 8 en el complejo receptor (Figura 9.18). Tras la activación, la caspasa 8 puede propagar la señal de muerte a través de la proteólisis restringida de Bid, similar a la vía de la granzima B descrita antes, o puede directamente procesar y activar las caspasas en cadena como caspasa 3. Sin embargo, la incapacidad que los ratones con desactivación génica de la perforina tienen para eliminar los virus de manera eficaz sugiere que los gránulos secretores proporcionan los medios dominantes para destruir las células infectadas. Tampoco debemos perder de vista que las células CD8 sintetizan otras citocinas, como TNF e IFNγ, que tienen asimismo poderosos efectos antivirales.

La activación de la caspasa coordina la muerte de la célula diana desde el interior

Como hemos visto, la vía final común de muerte celular implica la activación de los miembros de la familia caspasa de proteasas dentro de la célula diana, independientemente de si se ha iniciado a través de la vía de perforina/granzima o del receptor Fas. Las caspasas matan a las células a través de la proteólisis restringida (es decir, por el corte de las proteínas en sólo uno o dos sitios) de literalmente **cientos de sustratos proteicos**. Hasta la fecha se identificaron más de 600 sustratos para la caspasas apoptósicas mediante análisis proteómico global. Este enfoque de "**muerte por mil cortes**" asegura que el fracaso para romper algunas proteínas aquí o allí sea poco probable que permita que una célula escape de la garras de estas enzimas destructivas, una vez que se han puesto en marcha. Además de matar a la célula diana, las caspasas también provocan alteraciones en la membrana citoplasmática que atraen la atención de las células fagocíticas local y promueven la eliminación de la célula moribun-

da (Figura 9.19). Se han encontrado varias alteraciones de la membrana citoplasmática en las células apoptósicas; una de las más destacadas es la externalización de fosfatidilserina, un fosfolípido que suele estar confinado a la hoja interna de la membrana citoplasmática.

Las células apoptósicas son eliminadas con rapidez a través de la fagocitosis

Es probable que la inducción de la apoptosis por el LTC, como opuesta a la necrosis, tenga varios beneficios. Las células apoptósicas, en virtud de las alteraciones específicas en sus membranas citoplasmáticas, como se mencionó en la sección precedente, son reconocidas con rapidez por los macrófagos y otras células fagocíticas y sufren fagocitosis antes de que salga su contenido intracelular. Estas alteraciones de la membrana promueven el reconocimiento selectivo y la endocitosis rápida de las células apoptósicas por los macrófagos residentes en los tejidos, así como por las células fagocíticas no profesionales (Figura 9.19). La eliminación rápida de las células apoptósicas de los tejidos tiene el efecto deseable de minimizar el daño colateral de las células vecinas y también puede evitar el escape de partículas virales desde una célula infectada. Además, también es probable que las nucleasas y las proteasas caspasa que se activan dentro de la célula diana durante la apoptosis degraden los ácidos nucleicos y las proteínas estructurales virales y contribuyan a asegurar que la cantidad liberada de partículas virales infecciosas sea mínima.

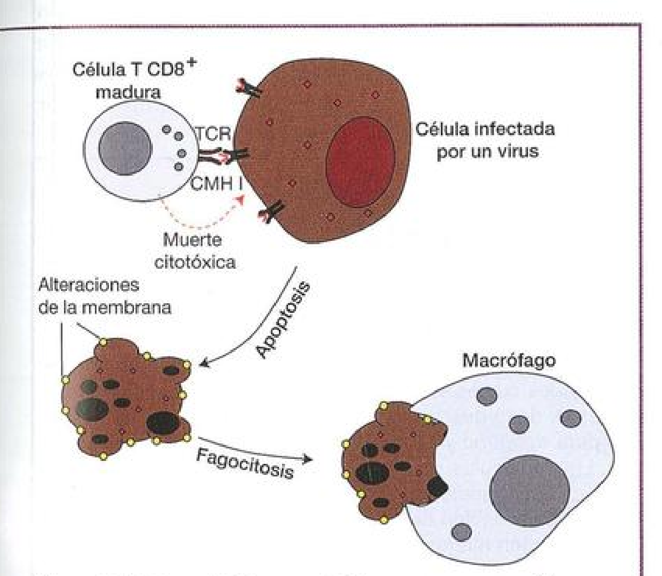


Figura 9.19. Las células apoptósicas son reconocidas y eliminadas con rapidez por los fagocitos.

Las células apoptósicas sufren varias alteraciones de membrana (un ejemplo es la externalización de fosfatidilserina sobre membrana citoplasmática) que permite que los fagocitos profesionales, así como los no profesionales, reconozcan y endociten a estas células antes de la ruptura de la membrana y la liberación de los contenidos intracelulares. En el contexto de la destrucción por una célula T citotóxica (Tc) de una célula infectada por un virus, esto puede también evitar la liberación de partículas virales que podrían de otro modo producirse si la muerte celular se llevara a cabo por medio de la necrosis (es decir, la ruptura celular).

La proliferación y la maduración de las respuestas de las células B están mediadas por citocinas

Tras de activación exitosa de una célula T *helper* dentro de las áreas de células T de un ganglio linfático, las células T activadas comienzan entonces, guiadas por las quimiocinas, la búsqueda de una célula B a la cual proporcionarle colaboración. Dentro de las áreas de células B del ganglio linfático, las células B que fueron activadas a través del entrecruzamiento de inmunoglobulina de superficie con el antígeno cognado presentado en las células foliculares dendríticas requieren de la ayuda de las células Th para la activación completa. Para recibir ayuda, la célula B necesita presentar el péptido antigénico correcto a una célula T que ya ha recibido estimulación por una célula dendrítica. La activación de las células B por las Th, a través del reconocimiento por el TCR del péptido antigénico unido al CMH más la **interacción coestimuladora CD40L-CD40**, conduce a la sobreexpresión del receptor de superficie para IL-4. La liberación copiosa local de esta citocina por las Th impulsa luego la proliferación y la expansión clonal poderosas de la población de células B activadas. La IL-2 y la IL-13 también contribuyen a este proceso (Figura 9.11).

Bajo la influencia de la IL-4 y la IL-13, los clones expandidos pueden diferenciarse y madurar como células que sintetizan IgE. El TGFβ y la IL-5 estimulan a las células a cambiar su clase de Ig a IgA. Los plasmocitos que expresan IgM surgen bajo la dirección de IL-4 más IL-5, mientras que los productores de IgG son el resultado de la influencia combinada de IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 e IFNγ (Figura 9.11).

Los antígenos timoindependientes de tipo 2 pueden activar directamente las células B pero, no obstante, siguen necesitando citocinas para la proliferación eficiente y la producción de Ig. Éstas pueden provenir de células accesorias como las NK y NKT, que tienen receptores similares a la lectina.

¿Qué sucede en el centro germinativo?

El folículo secundario con su corona o manto de linfocitos pequeños que rodean el centro germinativo pálido es una estructura celular notable y con características singulares. Recordemos en primer lugar los acontecimientos globales descritos en el Capítulo 7. La exposición secundaria al antígeno o a inmunocomplejos induce el aumento de tamaño de los centros germinativos, la formación de otros nuevos, la aparición de células B de memoria y el desarrollo de células productoras de Ig de mayor afinidad que ingresan en el centro germinativo se convierten en **centroblastos**, que se dividen con un ciclo muy corto de 6 horas y luego se convierten en **centrocitos** en la zona clara basal, los cuales no se dividen y muchos mueren por apoptosis (Figura 9.20). A medida que los centrocitos sobrevivientes maduran, se diferencian en **inmunoblastos precursores de plasmocitos**, que secretan Ig en ausencia de antígeno, o en **células B de memoria.**

¿Cuál es entonces el escenario subyacente? Tras la exposición secundaria al antígeno, las células B sensibilizadas pue-

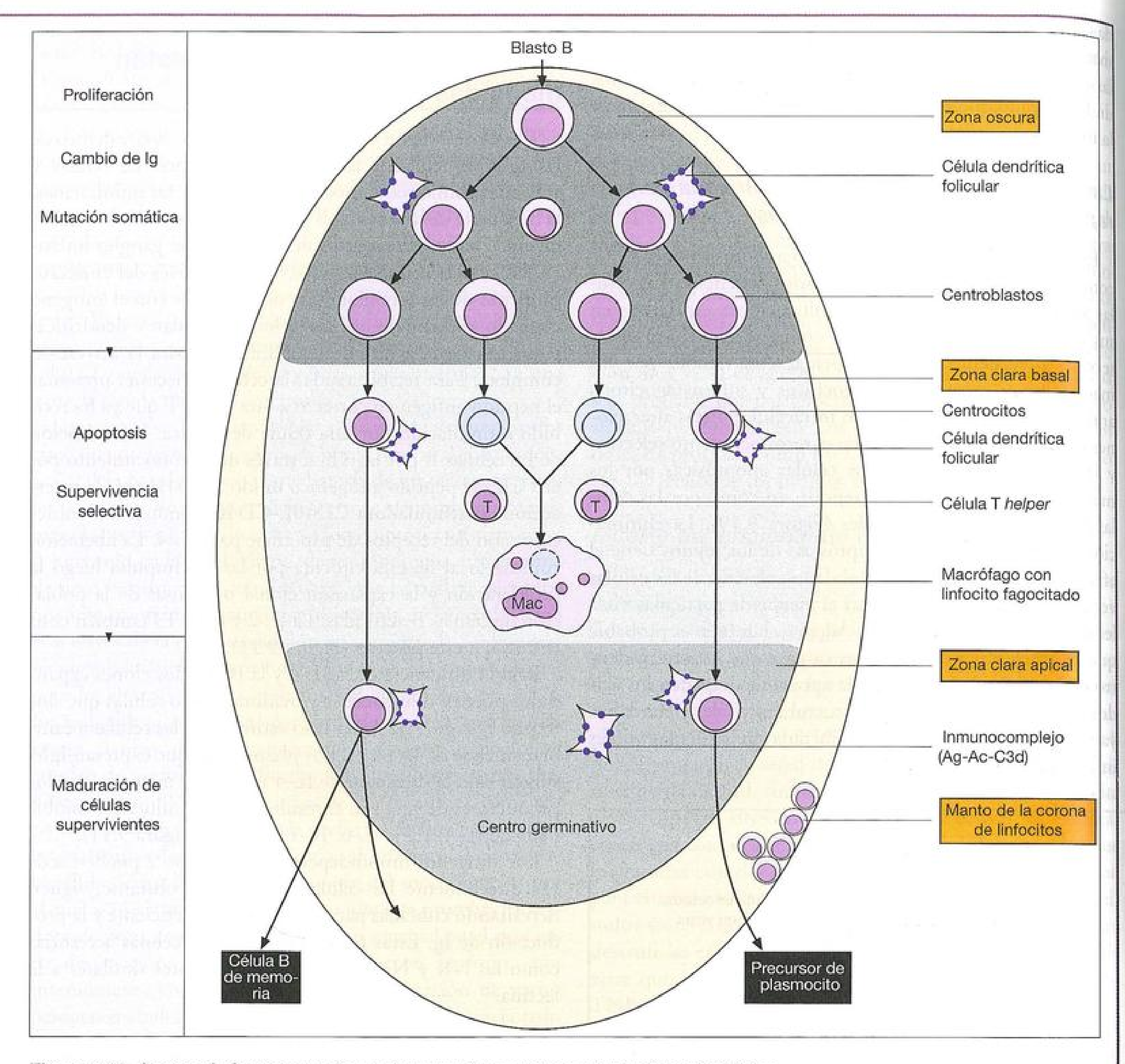


Figura 9.20. Acontecimientos que tienen lugar en los centros germinativos linfoides.

Las células B de los centros germinativos pueden ser enriquecidas por medio de su afinidad por la lectina aglutinina del maní. Estas células muestran numerosas mutaciones en los genes de los anticuerpos. La expresión de LFA-1 e ICAM-1 en las células B y las células dendríticas foliculares en el centro germinativo las torna "pegajosas". Los centroblastos en la base del folículo son fuertemente CD77 positivos. Las células Th tienen el marcador no habitual CD57. Todas las células dendríticas foliculares expresan CD21 y CD54; las de la zona clara apical presentan una fuerte positividad para CD23, las de la zona clara basal expresan poco CD23. A través de sus receptores de superficie, las células dendríticas foliculares se unen a inmunocomplejos que contienen antígeno y C3, los cuales son estimuladores muy eficaces de las células B, dado que la coligación de los receptores de superficie para antígeno y C3 (CR2) reduce su umbral de activación. Las moléculas coestimuladoras CD40 y B7 desempeñan funciones fundamentales. Los anticuerpos contra CD40 impiden la formación de centros germinativos y los anti-CD40L pueden alterar los centros germinativos establecidos dentro de las 12 horas. Anti-B7.2, administrado al comienzo de la respuesta inmunitaria, impide la formación de los centros germinativos y, cuando se administra al inicio de la hipermutación, suprime ese proceso.

den ser activadas por las células Th paracorticales en asociación con células dendríticas interdigitadas o macrófagos y migran al centro germinativo. Allí se dividen en respuesta a estímulos poderosos provenientes de complejos sobre las células dendríticas y de las citocinas liberadas por las células T en respuesta a las células B que presentan el antígeno. Durante este período de división celular particularmente vertiginoso, se produce la **hipermutación somática** de los genes de Ig de las células B. Las células también sufren un **cambio de clase de Ig**. Por consiguiente, a medida que se transforman en centrocitos, se tornan vulnerables y mueren con facilidad, de modo que son captadas como "cuerpos tingibles" por los macrófagos, a menos que sean rescatadas por la asociación con el antígeno sobre una célula dendrítica

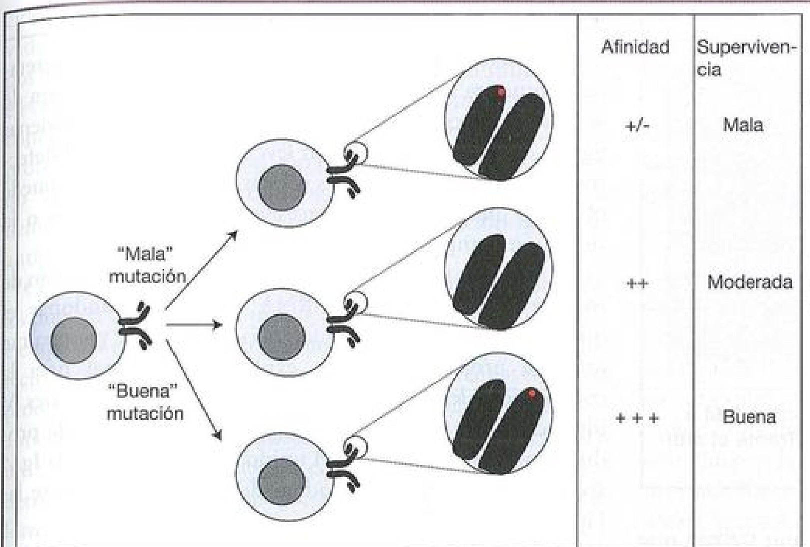


Figura 9.21. La selección darwiniana por el antígeno de las células B con mutantes de anticuerpos de alta afinidad protege contra la muerte celular en el centro germinativo, ya sea a través de entrecruzamientos de sIg con el antígeno en las células dendríticas foliculares o a través del reconocimiento por las células Th del antígeno procesado y la señalización a través de CD40. En ambos casos, la captura del antígeno, en particular a medida que disminuye la concentración, será críticamente afectada por la afinidad del receptor de superficie.

folicular. Esto podría ser el resultado del entrecruzamiento de los receptores de Ig de superficie y se acompaña de la expresión de Bcl-x y Bcl-2 que protegen de la apoptosis. Las interacciones entre BAFF (factor activador de la célula B de la familia del factor de necrosis tumoral; también denominado BLyS) en la célula T *helper* y el TACI (factor de interacción entre el activador de transmembrana y el modulador del calcio y el ligando de la ciclofilina [CAML]), su receptor en la célula B, también puede ser importante para el mantenimiento de las células B del centro germinativo. La señalización a través de CD40 y TACI, durante la presentación del antígeno a las células Th, también prolongaría la vida del centrocito. En cualquiera de los casos, las interacciones sólo sucederán si la superficie mutada del receptor Ig todavía liga el antígeno y, a medida que la concentración del antígeno disminuye gradualmente, sólo si el receptor es de alta afinidad. En otros términos, el sistema puede proporcionar anticuerpos de alta afinidad por un proceso darwiniano de mutación de alta frecuencia de los genes de Ig y de selección por el antígeno de las células que portan el anticuerpo que se une de un modo más firme (Figura 9.21). Este aumento de afinidad en la respuesta a medida que disminuyen las concentraciones de anticuerpo representa un beneficio evidente, ya que una pequeña cantidad de anti-

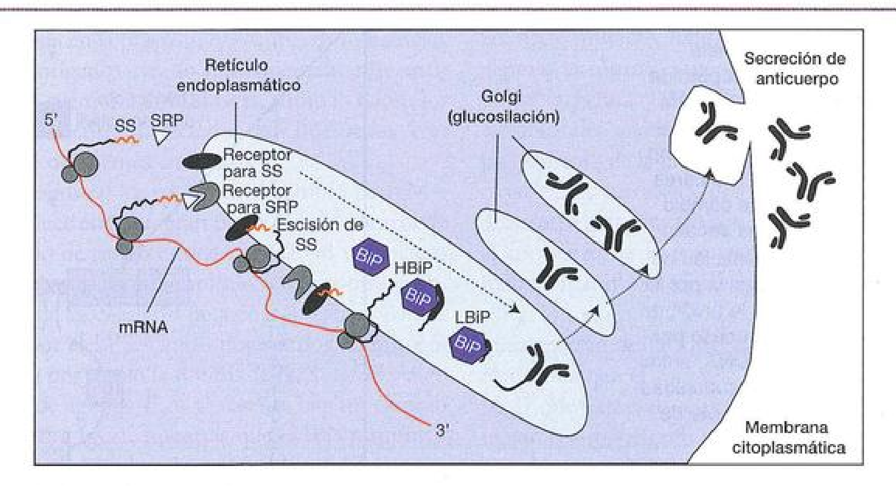


Figura 9.22. Síntesis de inmunoglobulina.

A medida que el mRNA se traduce sobre el ribosoma, la secuencia señal (SS) N-terminal está unida por una partícula de reconocimiento de señal (SRP), que se acopla en un receptor sobre la membrana externa del retículo endoplasmático y facilita el ingreso de la cadena naciente de Ig en la luz del retículo endoplasmático. La SS se asocia con un receptor de membrana específico y es escindida; el resto de la cadena, a medida que se alarga, forma complejos con la chaperona molecular BiP (proteína de unión de la cadena pesada) que se une a los dominios C_H1 y V_L de las cadenas pesadas para controlar el plegamiento de la proteína. Las cadenas no ensambladas se oxidan y se disocian como molécula completa de Ig H_2L_2. Las moléculas H_2L_2 ensambladas pueden abandonar entonces el retículo endoplasmático para la glucosilación terminal en el aparato de Golgi y la secreción final. La Ig del receptor de superficie sería insertada por sus secuencias hidrófobas en la membrana del retículo endoplasmático a medida que se sintetiza.

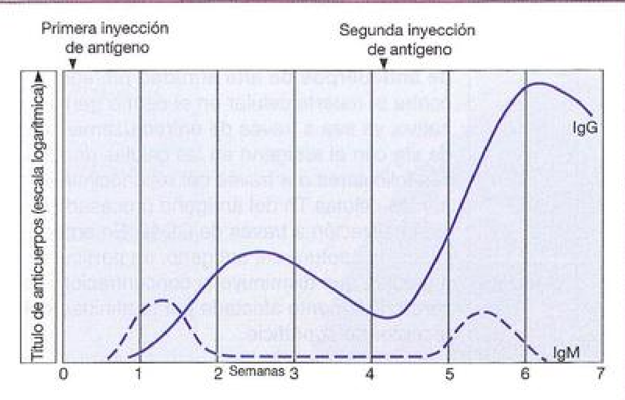


Figura 9.23. Síntesis de las clases de anticuerpos IgM e IgG en las respuestas primaria y secundaria frente al antígeno.

cuerpos de alta afinidad puede hacer el mismo trabajo que una gran cantidad de anticuerpos de baja afinidad (como en el boxeo, un luchador pequeño pero "bueno" generalmente dejará fuera de combate al "grande" pero mediocre).

En este momento, se produce una diferenciación adicional. Las células migran hasta los sitios de actividad de los plasmocitos (p. ej., la médula de los ganglios linfáticos) o continúan para expandirse a la dotación de células B de memoria de acuerdo con las señales recibidas por la citocina u otros mediadores. La ocupación de CD40 por el ligando CD40 en una célula T guía la célula B hacia el compartimiento de memoria.

Síntesis de anticuerpos

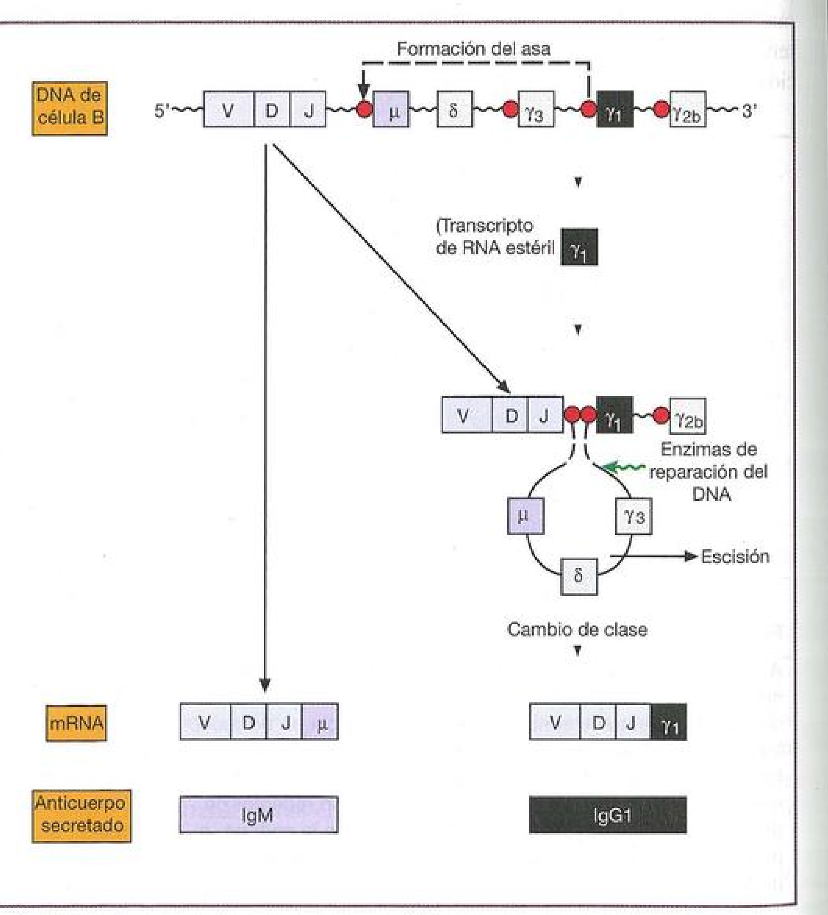
La secuencia de procesos de los cuales surge la Ig secretada se muestra en la Figura 9.22. En la célula formadora de anticuerpos normal, hay un recambio rápido de cadenas ligeras que están presentes en leve exceso. El control defectuoso tiene lugar en muchas células del mieloma y se puede observar una producción excesiva de cadenas ligeras o la supresión completa de la síntesis de cadenas pesadas.

Las regiones variable y constante se cortan y empalman de manera conjunta en el mRNA antes de abandonar el núcleo. Los mecanismos diferenciales de corte y empalme también proporcionan una explicación racional para la coexpresión de IgM e IgD de superficie con regiones V idénticas sobre una sola célula, y para el cambio de la producción del receptor de IgM unido a la membrana a la IgM secretora en la célula formadora de anticuerpos (véanse las Figuras 4.2 y 4.3).

El cambio de clase de inmunoglobulina se produce en las células B individuales

La síntesis de anticuerpos que pertenecen a las distintas clases de inmunoglobulina prosigue con diferentes velocidades. En general, hay una respuesta temprana de IgM que tiende a disminuir rápidamente. La síntesis de anticuerpos IgG aumenta hasta su nivel máximo en un período más prolongado. Con la exposición secundaria al antígeno, la evolu-

Figura 9.24. El cambio de clase para producir anticuerpos de especificidad idéntica pero isotipo diferente de inmunoglobulina (en este ejemplo, de IgM a IgG1) se logra mediante un proceso de recombinación que utiliza las secuencias de cambio especializadas (●) y conduce a una pérdida del asa de DNA interpuesta (μ, δ y γ3). Cada secuencia de cambio posee de 1 a 10 kilobases de longitud y comprende repeticiones con alto contenido en guanosina de 20-100 pares de bases. Dado que la secuencia de cambio asociada con cada gen C_H tiene una secuencia única de nucleótidos, la recombinación no puede producirse en forma homóloga y, por lo tanto, es probable que dependa de la unión de extremos no homólogos. En este proceso participan proteínas de reparación del DNA, entre las que se incluyen Ku70, Ku80 y la subunidad catalítica de la proteincinasa dependiente de DNA (DNA-PK_{cs}).



ción temporal de la respuesta de IgM se asemeja a la observada en la primaria. Por el contrario, la síntesis de anticuerpos IgG se acelera con rapidez hasta un título mucho más elevado y hay una disminución relativamente lenta en las concentraciones de anticuerpos en el suero (Figura 9.23). Es probable que suceda lo mismo con la IgA, y en algún sentido ambas clases de inmunoglobulinas proporcionan la defensa inmediata principal contra la penetración futura de antígenos extraños.

Como vimos en los Capítulos 3 y 4, las células B individuales pueden cambiar de la producción de IgM a la de IgG. Por ejemplo, la exposición al antígeno de receptores irradiados que reciben cantidades relativamente pequeñas de células linfoides produjo focos esplénicos de células, donde cada uno sintetiza anticuerpos de diferentes clases de cadena pesada que tienen un único idiotipo; el idiotipo común sugiere que cada foco deriva de una única célula precursora, cuya progenie puede formar anticuerpos de diferente clase.

La síntesis de anticuerpos en la mayoría de las clases muestra una dependencia considerable de cooperación de las células T en la que las respuestas en animales privados de células T son notablemente deficientes; esto es válido para las respuestas de anticuerpos IgG1, IgG2a, IgA, IgE y parte de la respuesta de anticuerpos IgM del ratón. Los antígenos timoindependientes, como el activador policlonal, el lipopolisacárido (LPS) de la endotoxina, inducen la síntesis de IgM y de algo de IgG2b e IgG3. La inmunopotenciación con el coadyuvante de Freund (una emulsión de agua en aceite que contiene antígeno en la fase acuosa y una suspensión de bacilos tuberculosos muertos en la fase oleosa) parece ocurrir, al menos en parte, mediante la activación de las células Th que estimulan la producción de anticuerpos en las clases timodependientes. La hipótesis que se deriva de esto, de que la respuesta frente a los antígenos timoindependientes (p. ej., polisacárido de *Pneumococcus*) no puede ser potenciada por el coadyuvante de Freund, es sostenida en la práctica; más aún, como mencionamos antes, estos antígenos evocan fundamentalmente anticuerpos IgM y escasa memoria inmunitaria, como lo hacen los antígenos timodependientes inyectados en huéspedes con timectomía neonatal deficientes en células T.

Por lo tanto, al menos en los roedores, el cambio de IgM a IgG y otras clases parece estar, en gran parte, bajo el control de las células T, mediado de modo crítico por CD40 y citocinas como mencionamos antes en este capítulo. Demos otra mirada a la estimulación de las células B pequeñas, positivas para la IgM de superficie, por el LPS. Como destacamos, el mitógeno inespecífico evoca por sí solo la síntesis de IgM, IgG3 y algo de IgG2b. Después de agregar IL-4 al sistema hay un cambio de clase de IgM a IgE e IgG1, mientras que el IFNγ estimula el cambio de clase de IgM a IgG2a, y TGFβ induce el cambio de IgM a IgA o IgG2b. Estas citocinas inducen la formación de transcritos estériles de la línea germinal que se inician en el exón I 5' (de iniciación) de la región de cambio para la clase de anticuerpos en la cual se producirá el cambio y terminan en el sitio de poliadenilación 3' del gen C_H relevante (Figura 9.24). Los transcritos no son traducidos; en cambio, se mantienen asociados con el DNA molde y forman híbridos RNA-DNA dentro de las regiones S del DNA que podrían actuar como dianas para las enzimas implicadas en el proceso de recombinación. Bajo la influencia de la recombinasa, un segmento del gen *VDJ* es transferido desde μδ al nuevo gen de la región constante (Figura 9.24) y de este modo produce anticuerpos de la misma especificidad, pero de clase diferente.

Las células B con cambio de clase están sometidas a altas tasas de mutación después de la respuesta inicial

El lector sin duda recordará que esta idea surgió en los Capítulos 3 y 4 cuando se analizó la generación de la diversidad, y que el centro germinativo ha sido identificado como el sitio de mutagénesis intensa, que es catalizada por la citidina desaminasa inducida por activación (AID). Esta enzima elimina un grupo amino (NH_2) de la desoxicitidina del DNA y provoca una reacción de reparación del DNA modificada que se traduce en la mutación de esta base a cualquiera de los cuatro nucleótidos. Esta reacción tiene lugar dentro de determinados "puntos calientes" (*hotspots*) en los genes de Ig, guiados por motivos de secuencia, así como por modificaciones de la cromatina, de tal modo que las mutaciones dependientes de AID se producen de preferencia dentro de las regiones *V*. La tasa de mutación normal de la región *V* es del orden de 10^{-5}/pares de bases por generación en las células B como resultado de la estimulación antigénica. Este proceso se muestra en la Figura 9.25, que grafica la acumulación de mutaciones somáticas en la estructura del anticuerpo V_H/V_K inmunodominante durante la respuesta inmunitaria a la feniloxazolona. Con el tiempo y con estímulos sucesivos, se observa que la tasa de mutaciones crece de modo notable, y en el contexto de este análisis, está claro que las hipermutaciones dirigidas estratégicamente que se producen dentro de las asas hipervariables que determinan la complementariedad o adyacentes a éstos (Figura 9.26) pueden originar células secretoras de anticuerpos que tienen una afinidad de combinación diferente de la de la célula progenitora original. De manera aleatoria, algunas células hijas mutadas tendrán mayor afinidad por el antígeno, algunas la misma o menor afinidad, y otras, tal vez ninguna (véase la Figura 9.21). Asimismo, las mutaciones en regiones estructurales pueden ser "silenciosas" cuando interrumpen el plegamiento de la proteína para dar origen a moléculas no funcionales. Es pertinente destacar que la proporción de células B del centro germinativo con mutaciones "silenciosas" es elevada al comienzo de la respuesta inmunitaria, pero disminuye de manera manifiesta con el tiempo, lo cual sugiere que a la diversificación temprana le sigue la expansión preferente de clones que expresan mutaciones capaces de mejorar su posibilidad de reaccionar con el antígeno y ser estimulados por éste. Las células B que expresan anticuerpos mutados que ahora fallan en reconocer el antígeno sufren apoptosis, mientras que es necesaria la estimulación antigénica continua por medio del receptor de la célula B para la supervivencia de la célula B durante esta fase.

Factores que afectan la afinidad de los anticuerpos en la respuesta inmunitaria

El efecto de la dosis de antígeno

En condiciones de igualdad de otros factores, la fuerza de unión de un antígeno por el receptor de superficie de una

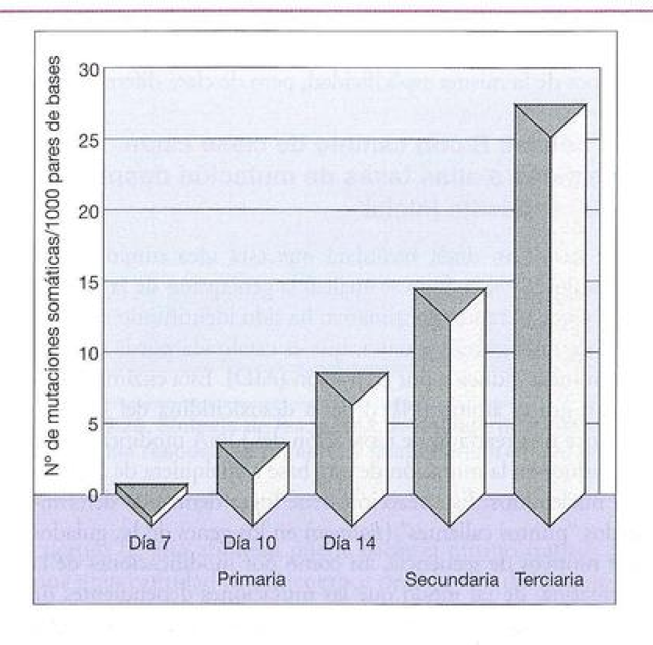


Figura 9.25. Mutaciones somáticas crecientes en los anticuerpos de la línea germinal inmunodominantes, observadas en hibridomas aislados luego de la inmunización repetida con feniloxazolona. (Datos de Berek C. y Apel M. ([1989]) En Melchers F. *et al.* [eds.] *Progress in Immunology* **7**, 99. Springer-Verlag.).

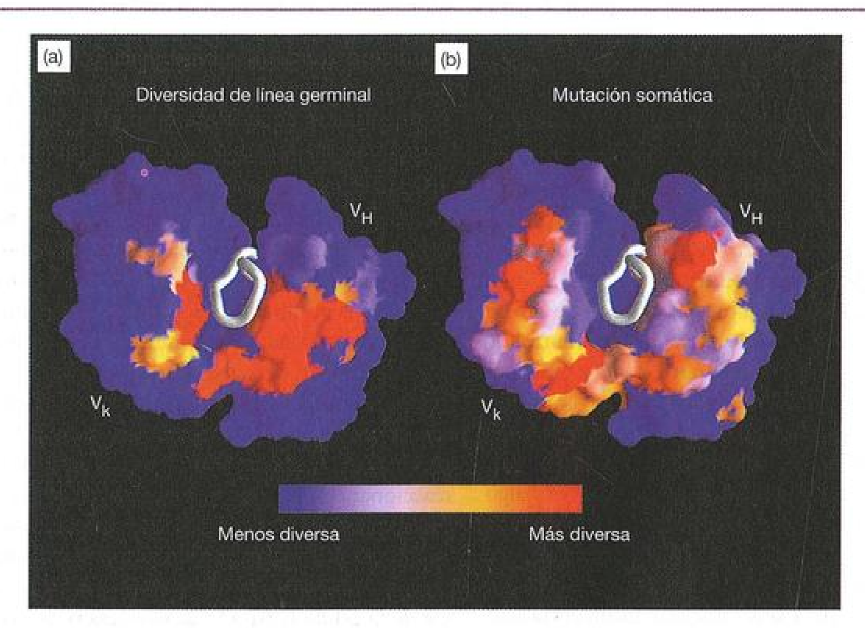


Figura 9.26. "Representación visual del antígeno" de diversidad de secuencia en anticuerpos humanos.

Se ha graficado la diversidad de secuencia en una escala de azul (más conservada) a rojo (más diversa). En ambos dibujos se encuentran el dominio V_H está a la derecha y el dominio V_κ a la izquierda. a) Diversidad de la línea germinal antes de que se focalice la hipermutación somática en el centro del sitio de unión del antígeno. b) La hipermutación somática propaga la diversidad a regiones en la periferia del sitio de unión, las cuales están altamente conservadas en el repertorio del gen *V* de la línea germinal. Por lo tanto, la hipermutación somática es complementaria para la diversidad de la línea germinal. El V_H CDR3, que se ubica en el centro del sitio de unión del antígeno, no fue incluido en este análisis y, por lo tanto, se muestra en gris como una estructura en asa. El extremo del V_κ CDR3 (también excluido) se encuentra en el centro del sitio de unión y no se ve en esta representación. (Reproducido con autorización de Tomlinson I.M. *et al.*, [1996], *Journal of Molecular Biology* **256**, 813.)

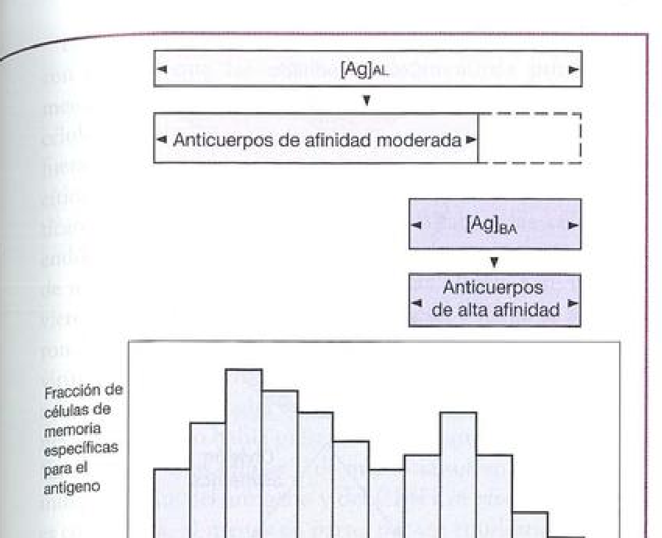


Figura 9.27. Relación de la concentración de antígenos con la afinidad de los anticuerpos producidos.

Las concentraciones bajas de antígeno ($[Ag]_{BA}$) se unen a distintas células de memoria de alta afinidad y permiten su estimulación; los anticuerpos resultantes son de alta afinidad. Las dosis altas de antígeno ($[Ag]_{AL}$) pueden unirse lo suficiente con células de baja afinidad y permitir así su estimulación, mientras que las células de máxima afinidad pueden unirse a un exceso de antígeno y ser tolerantes *(línea interrumpida)*; el antisuero resultante tendrá una población de anticuerpos de afinidad baja a moderada.

célula B estará determinada por la constante de afinidad de la reacción:

$$\text{Ag} + \text{Ac (superficie)} \rightleftharpoons \text{AgAc}$$

y los reactantes se comportarán según la ley de acción de masas.

Se puede suponer que, cuando una cantidad suficiente de moléculas de antígeno se une a los receptores sobre la superficie celular y es procesada para la presentación a las células T, el linfocito será estimulado para desarrollar un clon productor de anticuerpos. Cuando sólo se presentan cantidades pequeñas de antígeno, sólo los linfocitos con receptores de alta afinidad podrán fijar suficiente antígeno para que se produzca la estimulación, y sus células hijas, por supuesto, también generarán anticuerpos de alta afinidad. La consideración de la ecuación de equilibrio antígeno-anticuerpo mostrará que, a medida que aumenta la concentración de antígeno, incluso los anticuerpos con una afinidad relativamente baja fijarán más antígeno; por lo tanto, con altas dosis de antígeno, los linfocitos con receptores de menor afinidad también serán estimulados, y como puede observarse a partir de la Figura 9.27, son más abundantes que los que presentan receptores de alta afinidad. Además, existe una fuerte posibilidad de que las células con la máxima afinidad fijen tanto antígeno como para tornarse tolerantes. En resumen, las proporciones bajas de antígeno producen anticuerpos de alta afinidad, mientras que las concentraciones altas dan origen a un antisuero con afinidad baja a moderada.

Maduración de la afinidad

Además de ser más rápidas e intensas, las respuestas secundarias tienden a ser de mayor afinidad. Es probable que haya dos razones principales para esta maduración de la afinidad después de la estimulación primaria. Primero, una vez que comienza la respuesta primaria y declina la concentración del antígeno hasta niveles bajos, sólo las células con afinidad sucesivamente mayor se unirán al antígeno como para mantener la proliferación. Segundo, en esta etapa las células mutan de manera desquiciada en los centros germinativos, y cualquier mutante con una afinidad azarosamente mayor se unirá bien al antígeno sobre las células dendríticas foliculares y será seleccionado en forma positiva para su expansión clonal persistente. La modificación de la especificidad de anticuerpos por mutaciones puntuales somáticas permite la diversificación gradual sobre la cual puede actuar la selección positiva para la afinidad durante la expansión clonal.

Vale la pena destacar que las respuestas a los antígenos timoindependientes, que tienen una memoria poco desarrollada con mutaciones muy infrecuentes, no muestran este fenómeno de maduración de afinidad. En términos globales, la capacidad de Th para facilitar las respuestas a antígenos activadores no poliméricos en forma no policlonal, para inducir proliferación clonal expansiva, para lograr el cambio de clase y, por último, para ajustar las respuestas hasta una mayor afinidad brindó respuestas inmunitarias más grandes, mejores y más flexibles.

Células de memoria

Cuando la respuesta inmunitaria disminuye, la mayoría de las células efectoras recientemente expandidas es seleccionada mediante la inducción en gran escala de la apoptosis en esta población. En el Capítulo 8 describimos la importante función de las interacciones Fas-ligando Fas en este proceso y cómo las células T activadas efectoras se tornan susceptibles a las células que poseen el ligando Fas cuando envejecen. La fuente del ligando Fas que se encarga de eliminar las células recientemente expandidas puede ser la célula T en sí, de modo que las células T pueden destruirse a sí mismas de una manera autocrina (es decir, suicida) o pueden ser destruidas por otras células T vecinas que poseen el ligando Fas de una manera paracrina (es decir, fratricida). Mientras que las células T tanto vírgenes como activadas expresan el receptor Fas, las primeras están protegidas de los efectos de muerte celular del ligando Fas debido a la expresión de una molécula (FLIP) que rompe la cascada de señalización anterógrada de la estimulación del receptor que de otro modo activaría las propiedades de muerte celular de esta cascada. Las células B también son susceptibles a la muerte dependiente del ligando Fas, sobre todo si no consiguen recibir la estimulación dependiente de CD40L proveniente de una célula Th2 cognada. Sin embargo, una subpoblación de células escapa al proceso de selección y forma el **compartimiento de memoria** que persiste para montar una respuesta inmunitaria secundaria más rápida y eficaz tras la reexposición al mismo antígeno. Es posible que la población de células de memoria represente una subpobla-

ción que evita por completo el estadio de célula efectora, pero este concepto aún sigue siendo polémico. El proceso de generación de células de memoria es central para el concepto de vacunación y, por lo tanto, estas células han sido objeto de numerosas investigaciones.

Generación de la memoria

No está claro si las células efectoras y las células de memoria derivan del mismo compartimento celular o representan trayectorias de diferenciación distintas de los linfocitos activados. Se ha sugerido que las células efectoras y de memoria pueden ser demarcadas a través de la **división asimétrica** de las células T tras la estimulación productiva con el antígeno (Figura 9.28). En este modelo, el polo celular más cercano a la sinapsis inmunitaria (es decir, el punto en el cual la células T y la célula dendrítica o la célula diana forman interacciones productivas TCR-péptido/CMH) puede tener una distribución de **determinantes del destino celular** (es decir, factores de transcripción) diferente hacia el polo opuesto de la célula. La distribución de los determinantes del destino celular dentro de una célula puede ser regulada por proteínas del complejo de polaridad. La división posterior la célula T activada puede distribuir esos determinantes del destino celular en forma asimétrica entre las células hijas, y esto podría configurar las trayectorias de diferenciación de células efectoras versus de memoria (Figura 9.28). Hay algunas pruebas en apoyo de este modelo en el que la proteína del complejo de polaridad Scribble se asocia con la sinapsis inmunitaria, mientras que otra proteína del complejo de polaridad, PKCξ se asocia con el polo opuesto de la célula. Además, algunos estudios han informado que la célula hija que hereda la sinapsis inmunitaria tiene mayores niveles de expresión de LFA-1 y se convierten en células efectoras; el otro polo celular se convierte en células de memoria (Figura 9.28). Sin embargo, también hay evidencias de que células efectoras pueden convertirse en células de memoria, por lo que la cuestión no está clara.

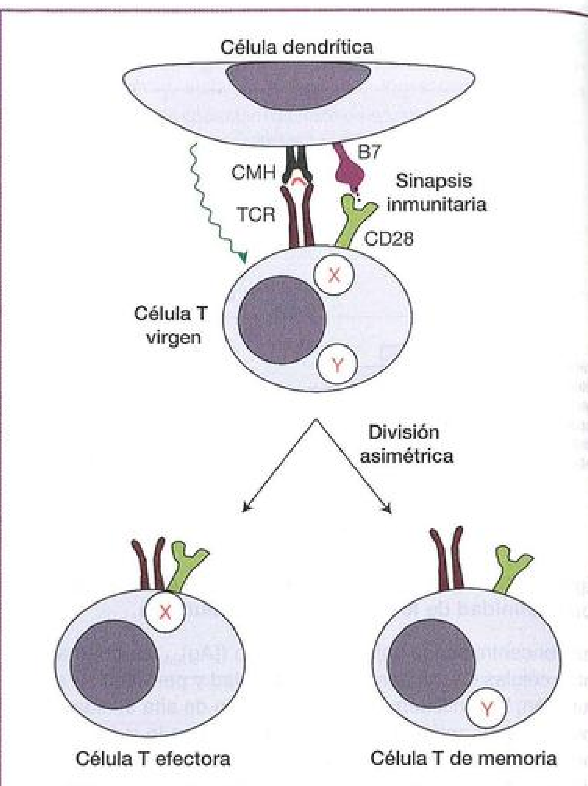


Figura 9.28. La división celular asimétrica puede contribuir a la generación de células efectoras respecto de las células de memoria.

Un mecanismo posible para la generación de célula T efectoras respecto de las célula T de memoria de vida prolongada es a través de la división asimétrica de célula T vírgenes activadas debido a la distribución desigual de determinantes del destino celular, designados aquí como "X" y "Y" a los fines ilustrativos, que pueden influir en la asignación del destino celular. Los determinantes del destino celular podrían ser factores de transcripción que pueden asignar a las células a vías de diferenciación distintos y pueden ser segregados de manera desigual dentro de las células como consecuencia de la unión a proteínas complejas de polaridad diferente que restringen su libre difusión. En este diagrama, el determinante del destino celular "X" está unido próximo a la sinapsis inmunitaria y especifica el destino de la célula efectora en la división celular subsiguiente. Por el contrario, el determinante del destino celular "Y" está unido al polo opuesto y asigna la célula al destino de célula de memoria en la división siguiente.

¿Es necesaria la persistencia del antígeno para el mantenimiento de la memoria?

Los anticuerpos codificados por los genes de la línea germinal no mutados representan una forma de memoria evolutiva, en el sentido que tienden a incluir especificidades para los patógenos encontrados habitualmente y aparecen en la denominada fracción de "anticuerpos naturales" séricos. La memoria adquirida durante la respuesta inmunitaria adaptativa requiere el contacto con el antígeno y la expansión de células de memoria específicas para el antígeno, como se observó por ejemplo en el aumento de 20 veces en los precursores de células T citotóxicas tras la inmunización de hembras con el antígeno H-Y masculino.

La memoria de infecciones tempranas, como el sarampión, es duradera y **surge la pregunta de si las células de memoria tienen una vida prolongada o están sometidas a una estimulación antigénica repetida por la persistencia del antígeno o por la reinfección subclínica.** En 1847, Peter Panum describió una epidemia de sarampión en las Islas Feroe en el año anterior, en la que casi toda la población sufrió la infección, salvo algunas personas ancianas que se habían infectado 65 años antes. Aunque estos datos hablan a favor de la hipótesis de la vida media prolongada, la función de memoria de las células B transferidas a un receptor singénico irradiado se pierde dentro del mes, a menos que se administre antígeno o que el donante sea transgénico para el gen *bcl-2* (recuérdese que las señales en el centro germinativo que impiden la apoptosis de las células B centrocíticas también sobreexpresan *bcl-2*). Se considera que la memoria de las células B es un estado dinámico en el cual la supervivencia de las células de memoria se mantiene por señales recurrentes que provienen de las células dendríticas foliculares en los centros germinativos, el único depositario duradero del antígeno.

Los datos obtenidos a partir de modelos murinos sugieren con firmeza que **las células T de memoria pueden, al menos en principio, persistir en ausencia de antígeno.** Las células T aisladas de ratones varios meses después de que fueran inmunizados con el virus de la coriomeningitis linfocítica (CML) se transfirieron a dos grupos de ratones genéticamente modificados en los que faltaban las células T endógenas; además, uno de los grupos carecía de expresión de moléculas de clase I del CMH. Las células T se mantuvieron en estos ratones durante 10 meses y luego se analizaron *in vivo.* Los LTC CD8+ funcionales y específicos para el virus aún se encontraban presentes en ambos grupos de ratones y en cantidades similares, si bien en los de los ratones de clase I– no había presentación del antígeno a su TCR. En realidad, estas células T de memoria sufren proliferación independiente del antígeno y del CMH *in vivo*, su cantidad es controlada, al menos en parte, por un equilibrio entre las señales inductoras de proliferación de la IL-15 y las señales inductoras de muerte celular de la IL-2 liberada en el entorno local, y ambas citocinas se unen a la cadena β del IL-2R (véase la Figura 9.4). Otros hallazgos recientes indican que la memoria de las células T *helper* tampoco requiere la presencia continua del antígeno o el CMH, y al menos en algunos casos, la memoria de Th se mantiene en ausencia de división celular.

Sin embargo, no se debe perder de vista que, aun cuando estos experimentos en animales transgénicos y obtenidos por desactivación génica demuestran con claridad que la memoria inmunitaria puede mantenerse en ausencia de antígeno, el antígeno persiste generalmente como complejos sobre las células dendríticas foliculares. Por consiguiente, es posible que las células presentadoras de antígeno dentro del centro germinativo capturen y procesen esos complejos antigénicos y luego los presenten a las células T de memoria. Algunos datos, también recientes, sugieren que es una clase de célula dendrítica, y no las células B del centro germinativo, la que puede cumplir esta función. Para agregar mayor complejidad, hay también evidencias de que los mecanismos utilizados para mantener las células T de memoria en el ratón, un animal con una vida relativamente breve, pueden diferir significativamente de los empleados por el sistema inmunitario humano. **El antígeno específico puede desempeñar un papel mucho más importante para mantener los linfocitos T de memoria en los seres humanos, porque la entrada continua de nuevas células específicas para antígenos diversos al compartimiento de memoria generará competición entre estas células.** Como las dotaciones de células vírgenes y de memoria se mantienen en un tamaño relativamente constante, es probable que las células de memoria que reciben reestimulación periódica con el antígeno persistan más tiempo que las que no experimentan un nuevo encuentro. La competición puede estar ausente o disminuir en modelos murinos donde los animales se mantienen en ambientes artificialmente limpios; es probable que en estos casos se reduzca el ritmo de entrada de nuevas especificidades de células T al compartimiento de memoria y disminuya en consecuencia la competición entre las poblaciones de células de memoria. En apoyo de este punto de vista, si bien hay datos que indican que las células T de memoria en los seres humanos pueden persistir décadas después de la exposición a antígenos particulares, la inmunidad disminuye efectivamente con el tiempo y se estima que la semivida de las respuestas de células T varía entre 8 y 15 años. Además, como la vida de los ratones de laboratorio es mucho más corta que el promedio de los seres humanos, es probable que los problemas asociados con la retención de células de memoria en éstos sean mayores que los que enfrentan los ratones de laboratorio. El desgaste continuo de las células T de memoria, en ausencia de la reestimulación antigénica, puede contribuir al aumento de la proporción y la gravedad de las enfermedades infecciosas en el anciano y también explicaría por qué los virus latentes, como el de la varicela-zóster (herpes virus humano 3), pueden reactivarse muchos años después de la infección inicial.

La población de memoria no es simplemente una expansión de las células vírgenes correspondientes

En general, las células de memoria son estimuladas con más facilidad mediante una dosis dada de antígeno porque tienen una afinidad mayor. En el caso de las células B, hemos estado satisfechos por la evidencia que relaciona la mutación y la selección dirigida por el antígeno, que se produce dentro de los centros germinativos de los folículos de los ganglios linfáticos secundarios, con la creación de células de memoria de alta afinidad. Los receptores para el antígeno en las células T de memoria también tienen mayor afinidad pero, como no sufren una mutación somática importante durante la respuesta a la estimulación, parecería que **las células con receptores preexistentes de afinidad relativamente mayor en la población de células vírgenes proliferan de manera selectiva a través de la unión preferente con el antígeno.**

Intuitivamente, no es de esperar que aumente la afinidad en la misma medida en que puede lograrse la hipermutación somática para las células B, pero las células T de memoria aumentan su avidez de unión para la célula presentadora de antígenos por medio de la mayor expresión de moléculas de adhesión accesorias, CD2, LFA-1, LFA-3 e ICAM-1. Puesto que varias de estas moléculas también actúan aumentando la transducción de señales, la célula T de memoria es estimulada con más facilidad que su equivalente celular virgen. De hecho, las células de memoria comienzan la división celular y secretan citocinas con más rapidez que las células vírgenes, y hay algunos datos de que pueden secretar una gama más amplia de citocinas que las células vírgenes.

Un cambio fenotípico en la isoforma del antígeno común leucocítico CD45R, proveniente del corte y empalme diferencial, permite hacer cierta distinción entre las células vírgenes y las células de memoria. La expresión de CD45RA se utilizó como marcador de las células T vírgenes y la de CD45RO como un marcador de las células de memoria capaces de responder a los antígenos de recuerdo. Sin embargo, la mayor parte de las características asociadas con el subgrupo CD45RO son en realidad manifestaciones de **células activadas** y las células CD45RO pueden revertirse al fenotipo CD45RA. Las células de memoria, tal vez en

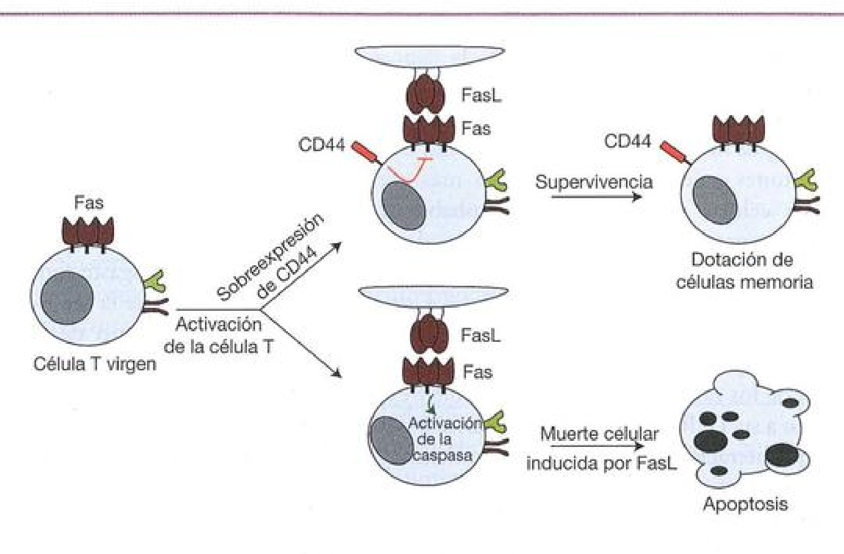


Figura 9.29. CD44 puede antagonizar la apoptosis dependiente de Fas-ligando Fas de las células T expandidas.

Las células T se tornan susceptibles a las señales de activación de la apoptosis que viajan a través de los receptores Fas de superficie en el transcurso de unos pocos días después de la activación. La fuente de ligando Fas (FasL) puede ser de las propias célula T activadas (autocrina), una célula T activada vecina (paracrina), una célula T citotóxica o una célula dendrítica. La sobreexpresión de CD44 de superficie parece ser capaz de interferir con las señales dependientes de Fas para la apoptosis, por un mecanismo aún no aclarado, y esto puede proteger a las células T activadas de la eliminación y permitir que ingresen en el compartimiento de memoria. Obsérvese que este mecanismo sólo puede aplicarse a las células Th1.

ausencia de estimulación antigénica, pueden perder por lo tanto su estado activado y unirse a la dotación de células en reposo. Otro marcador utilizado para diferenciar las células vírgenes de las células de memoria da un paso atrás en la escalera de CD y utiliza las diferencias en la expresión relativa de la molécula de adhesión CD44; las células T vírgenes parecen expresar niveles bajos de CD44, mientras que las células T de memoria expresan niveles elevados.

Papel del CD44 en antagonizar las señales dependiente de Fas para la apoptosis

Investigaciones recientes sugieren que CD44 puede ser importante para la entrada en el compartimento de las células de memoria a través de la inhibición de las señales dependientes de Fas para la apoptosis (Figura 9.29). Como señalamos, las interacciones Fas–FasL cumplen una función importante en la eliminación de una proporción considerable de linfocitos recientemente activados. Además de tornarse susceptibles a la apoptosis dirigida por FasL, las células T activadas inducen la sobreexpresión en la superficie de CD44 y, por consiguiente, mantienen una expresión elevada, si bien no queda del todo claro el papel de CD44 en la función de la célula T; sin embargo, observaciones recientes implican al CD44 en la función de determinar la entrada en el compartimento de memoria. Las células Th1 deficientes en CD44 específicas para el virus de influenza en comparación con las células originales se transfirieron a ratones normales; el desafío antigénico ulterior produjo respuestas robustas de recuerdo antigénico en las células CD44 positivas mientras que las células deficientes en CD44 fallaron en responder al antígeno. La deficiencia de CD44 no parece repercutir en la activación de células T, en la expansión en respuesta al antígeno ni en la adquisición de la función efectora. Sin embargo, estas células fueron susceptibles a la apoptosis dependiente de Fas durante los últimos estadios de expansión a diferencia de aquellas que expresan CD44, aunque permanecen sin aclararse los mecanismos para este efecto. Como advertencia, la protección mediada por CD44 se aplica sólo a las células Th1 y así, mecanismos diferentes pueden operar en las distintas subpoblaciones de células T.

Lanzavecchia y cols. propusieron que el receptor para quimiocinas CCR7 permite distinguir entre las células T CCR7$^+$ de "memoria central", que se diferencian a partir de las células T vírgenes, y las células T CCR7$^-$ de "memoria efectora", que surgen posteriormente de las células T de memoria central (Figura 9.30). Ambas poblaciones tienen una vida prolongada. Las células de memoria central proporcionan una dotación con expansión clonal de células sensibilizadas (cebadas) por el antígeno que pueden dirigirse hasta los órganos linfoides secundarios bajo la influencia de la quimiocina CCL21 (SLC) (véase el Cuadro 9.2), y después del nuevo encuentro con el antígeno, pueden estimular a las células dendríticas, ayudar a las células B y generar células efectoras. Por el contrario, las células T de memoria efectoras contienen receptores CCR1, CCR3 y CCR5 para quimiocinas proinflamatorias y constituyen células residentes en los tejidos que median reacciones inflamatorias o de citotoxicidad.

Mantenimiento de las células de memoria

En los últimos tiempos, se demostró que la IL-7 ejerce una acción reguladora importante en la supervivencia de las células T periféricas y el recambio homeostático. Al contrario de lo que sucede con la mayoría de las otras citocinas, que utilizan receptores que contienen la cadena γ (CD132) común, la IL-7 se produce de manera constitutiva en niveles bajos, se detecta en el suero humano y puede contribuir al mantenimiento independiente del antígeno de células T de memoria CD4 y CD8, por estimulación de la división homeostática de estas células. Aunque los estudios con ratones deficientes en CMH han demostrado que las interacciones péptido-CMH no son esenciales para la persistencia de las células T de memoria, las células T CD4 disminuyen con rapidez en ausencia de IL-7. La expresión de IL-7R es máxima en las células en reposo, lo cual asegura que estas células compitan de manera más eficaz por la IL-7 disponible que las células T efectoras activadas. En realidad, la estimulación por medio del TCR induce la inhibición del receptor para

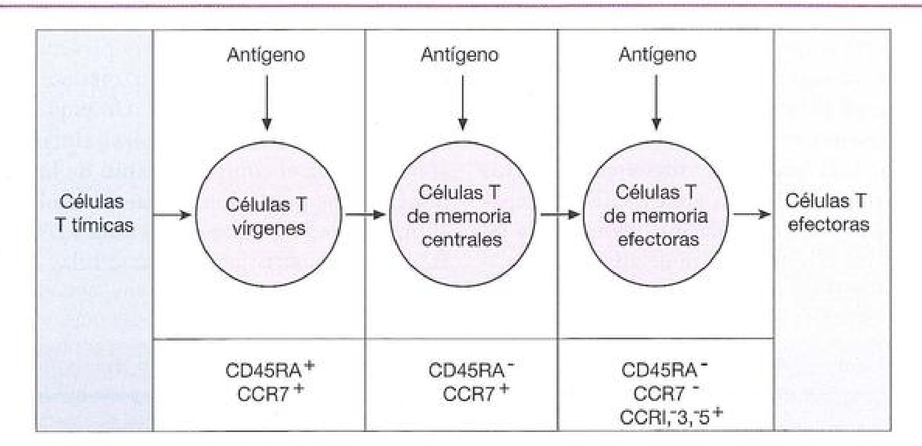


Figura 9.30. Células T de memoria centrales y efectoras.

Las células T vírgenes tienen la variante de corte y empalme CD45RA de la molécula CD45 y son atraídas desde el timo al tejido linfoide secundario por la influencia de quimiocinas de unión a CCR7, como CCL19 (MIP-3β) y CCL21 (6Ccina/SLC). Tras el encuentro con el antígeno, algunas de estas células se convierten en efectoras de la respuesta inmunitaria primaria, mientras que otras se diferencian en células T de memoria centrales que retienen el receptor de la quimiocina CCR7, pero pierden la expresión de CD45RA. El reencuentro ulterior con el antígeno empuja a estas células al compartimiento de memoria efectora con reemplazo de CCR7 por otros receptores para quimiocinas, como CCR1, CCR3 y CCR5. Esto cambia las características de asentamiento de estas células, que podrán reubicarse como células T secretoras de citocinas o citotóxicas en los sitios inflamatorios, bajo la influencia de algunas quimiocinas como CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP-1β) y CCL5 (RANTES) (véase el Cuadro 9.2). Obsérvese que mientras la activación y la diferenciación posterior de estas células depende del antígeno, se cree que tanto las células T de memoria centrales como las de memoria efectoras tienen una vida prolongada en ausencia del antígeno.

IL-7 a medida que las células T efectoras reciben la influencia de las citocinas producidas durante las respuestas inmunitarias (como IL-2, IL- 4, IL-7, IL-15 e IL-21). Cuando la respuesta disminuye, una vez más las células T se tornan dependientes de la IL-7 para su supervivencia continua. Así, la idea actual es que la IL-7 contribuye al mantenimiento T independiente del antígeno de las células al permitir la división homeostática de estas células en ausencia del estímulo antigénico (Figura 9.31). La IL-15 también parece ser más importante para el mantenimiento de las células T de memoria CD8 cuando los ratones deficientes en IL-15 o IL-15R de cadena α despliegan células T de memoria CD8 reducidas que pueden rescatarse por transferencia de estas células a ratones normales. Así, la IL-7 y la IL-15 parecen actuar en forma conjunta para mantener la dotación de células T de memoria, y esto es particularmente importante para el mantenimiento de las células T de memoria CD8 (Figura 9.31).

La persistencia de células de memoria también puede ser influida por factores físicos, como la longitud de los **telómeros cromosómicos** que impone un límite al número de divisiones que puede sufrir la mayoría de las células de mamíferos: el denominado **límite de Hayflick**. La erosión progresiva de los telómeros cromosómicos durante cada división celular puede producir células que entran en un estado de senectud a partir del cual no pueden salir. En esta situación, las células son incapaces de dividirse más y es probable que estén afectadas desde el punto de vista funcional y por consiguiente sean de escasa utilidad para el sistema inmunitario. En muchos tipos celulares, el límite de Hayflick se alcanza de modo característico al cabo de 40 a 50 divisiones celulares, si bien los linfocitos pueden sufrir algunas divisiones más que éstas debido a la sobreexpresión de la enzima que alarga el telómero, la **telomerasa**, dentro de los linfocitos activados. Se ha informado que las células T CD8 fallan en

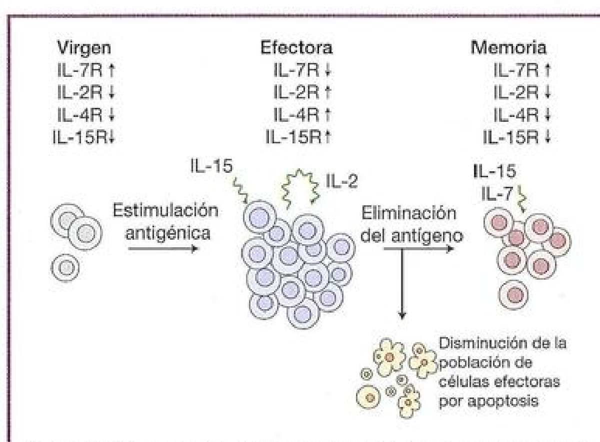


Figura 9.31. La expresión del receptor para citocina y la disponibilidad de citocina controlan la proliferación y la supervivencia de las células T.

Las células T CD4 y CD8 vírgenes expresan niveles altos de IL-7R y niveles bajos de receptores para otras citocinas, como IL-2, IL-4 e IL-15, que pueden influir en la proliferación y la supervivencia de las células T. La estimulación antigénica induce la inhibición de IL-7R y la sobreexpresión de los receptores para IL-2, IL-4 e IL-15 a medida que estas citocinas mantienen la expansión clonal y la supervivencia de las células T durante la fase efectora de la respuesta inmunitaria. Durante la resolución de la respuesta inmunitaria, la apoptosis masiva se produce dentro del compartimiento celular efector que deja sólo las células "más adaptadas" para convertirse en células de memoria. El compartimiento de células de memoria parece contar con la IL-7 para la supervivencia a largo plazo, pero también se considera la necesidad de la IL-15, en particular para el mantenimiento de las células T de memoria CD8.

expresar la telomerasa después de cuatro reestimulaciones con el antígeno, mientras que las células T CD4 pueden retener esta capacidad durante mucho más tiempo.

Las células B vírgenes pierden sus IgM e IgD de superficie y cambian el isotipo del receptor al convertirse en células de memoria, y la expresión diferencial de estos marcadores de superficie facilitó en gran medida la separación de las células B y T en poblaciones vírgenes y de memoria para su mejor estudio. Las moléculas coestimuladoras B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86) son sobreexpresadas con rapidez en las células B de memoria, y la potente capacidad de estas células para presentar el antígeno a las células T podría explicar la naturaleza enérgica y robusta de las respuestas secundarias. Un esquema similar al señalado en la Figura 9.30 para las células T también puede aplicarse para el compartimiento de linfocitos B, que dispone de una población inicial de células de memoria con el marcador B220 que evoluciona a células B de memoria B220⁻ para luego generar las células efectoras secretoras de anticuerpos.

RESUMEN

La activación de las células T produce la sobreexpresión de una sucesión de genes

- Dentro de los 15 a 30 minutos, se expresan los genes para los factores de transcripción relacionados con la progresión de G0 a G1 y el control de IL-2.
- Hasta 14 horas se expresan las citocinas y sus receptores.
- Más adelante, se sobreexpresan diversos genes que se vinculan con la división y la adhesión celulares.
- Las células T activadas se diferencian en células efectoras después de 4-5 días de la expansión clonal.

Mecanismos efectores

- El sistema inmunitario innato utiliza varios mecanismos efectores diferentes (como la fagocitosis, la activación del complemento y el despliegue de células que contienen gránulos citotóxicos, como células NK y eosinófilos) para combatir la infección.
- De manera similar, la inmunidad adaptativa también emplea varios mecanismos efectores, que incluye el desarrollo de células T citotóxicas (Tc o LTC), células T *helper* (Th) y células B secretora de anticuerpos. Las células Th pueden subdividirse aún más en células Th1, Th2 y Th17 sobre la base de los perfiles de citocinas que producen estas células y esto confiere funciones efectoras diferentes en estas células.
- Las citocinas tienen gran influencia en la generación así como la función específica de efectores dentro del sistema inmunitario adaptativo.
- Las células dendríticas, con contribuciones de otras células del sistema inmunitario innato, desempeñan una función central en la generación de efectores a través de la provisión de la señal 3, que representa patrones separados de citocinas que tienen influencias polarizadoras sobre las células efectoras generadas con posterioridad.

Las citocinas actúan como mensajeros intercelulares

- Las citocinas actúan en forma transitoria y, por lo general, son de corto alcance, aunque la IL-1 y la IL-6 circulantes pueden mediar la liberación de proteínas de fase aguda desde el hígado.
- Las citocinas son, en su mayoría, proteínas pequeñas que actúan a través de receptores de superficie que pertenecen a seis familias estructurales.
- La dimerización de subunidades individuales inducidas de la principal familia de receptores (eritropoyetina) activa a las proteínas tirosincinasas, entre las que se incluyen las JAK, y conduce a la fosforilación y conduce a la fosforilación y la activación de los factores de transcripción STAT.
- La señalización de citocinas puede ser inhibida por los miembros de la familia SOCS y PIAS de inhibidores que actúan, respectivamente, para suprimir la actividad de JAK y la transcripción dependiente de STAT.
- Las citocinas son pleiotrópicas, es decir, tienen múltiples efectos en las áreas generales de: a) control del crecimiento de linfocitos, b) activación de mecanismos de la inmunidad innata (incluso la inflamación), y c) control de la hematopoyesis de la médula ósea (véase la Figura 9.4).
- Las citocinas pueden actuar de manera secuencial, a través de una citocina que induce la producción de otra, o por transmodulación del receptor para otra citocina; también pueden hacerlo en forma sinérgica o antagónica.
- Las funciones *in vivo* de las citocinas pueden evaluarse por "desactivación" génica, transfección o inhibición por anticuerpos específicos.

Las células T activadas proliferan en respuesta a las citocinas

- La IL-2 actúa como factor de crecimiento autocrino para las Th1 y paracrino para las células Th2 que tienen sobreexpresados sus receptores IL-2.
- Las citocinas actúan sobre las células que expresan el receptor para la citocina adecuado.

Las diferentes subpoblaciones de células T pueden elaborar citocinas distintas

- El entorno de la citocina que se establece dentro de los estadios iniciales de infección tiene una influencia importante en el patrón de citocinas secretado por las poblaciones de células Th.
- A medida que la inmunización prosigue, las células Th tienden a evolucionar en tres subpoblaciones: las células Th1, vinculadas con procesos inflamatorios, la activación de macrófagos y la sensibilidad retardada elaboran IL-2, IL-3, IFNγ, TNF, linfotoxina y GM-CSF; las células Th2 ayudan a las células B a sintetizar anticuerpos y secretan IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13, TNF y GM-CSF; las células Th17 montan respuestas inflamatorias masivas contra hongos y bacterias extracelulares, en especial en las superficies de las mucosas. Las células Th17 elaboran IL-17A, IL-21, IL-22 e IL-17F e inducen la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias por las células no inmunitarias, como células endoteliales y fibroblastos, para favorecer el reclutamiento de neutrófilos al sitio de inflamación.
- La interacción del antígeno con los macrófagos o las células dendríticas, por medio de sus receptores de tipo Toll (TLR) y otros receptores para el reconocimiento del patrón, conduce a la producción de IL-12 e IL-27 que desvía las respuestas de células T hacia el tipo Th1 o la IL-4 que desvía las respuestas hacia el polo Th2. La IL-6 en combinación con el TGFβ inicialmente, seguido por IL-23 después, es importante para la producción de células Th17.

- Pueden existir otras subpoblaciones, como células Treg Foxp3+ inducibles naturales y Treg Foxp3+ inducibles o células reguladoras Th3 (Tr1) que secretan TGFβ.

Células T efectoras CD4 positivas en la inmunidad mediada por células

- Las citocinas median las respuestas inflamatorias crónicas e inducen la expresión de moléculas de clase II del CMH en las células endoteliales, en distintas células epiteliales y en muchas líneas de células tumorales, de manera que se facilitan las interacciones entre las células T y las células no linfoides.
- La expresión diferencial de receptores para quimiocinas permite el reclutamiento selectivo de neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y células T y B.
- TNF ejerce un efecto sinérgico con IFNγ en la destrucción de las células.
- La inflamación mediada por las células T está intensamente inhibida por la IL-4 y la IL-10.

Las células T reguladoras (Treg) controlan las acciones de las células T *helper*

- Existen diferentes clases de Treg. Las Treg naturales se generan en el timo y con células T Foxp3+ que pueden antagonizar en forma dominante las acciones de las células T autorreactivas.
- Las células Treg Inducibles pueden ser producidas a través de la estimulación subóptima mediada por TCR, sobre todo en presencia de IL-10 o TGFβ.
- Las células Treg ejercen sus efectos a través de diferentes mecanismos, que incluyen la secreción de citocinas inmunosupresoras IL-10, TGFβ e IL-35, la muerte de las células T autorreactivas a través de granzima B/perforina, la competición por la IL-2 o los efectos mediados por CTLA-4.
- El antagonismo de la presentación eficaz del antígeno mediado por CTLA-4 y la coestimulación de las células dendríticas por las Treg puede ser un mecanismo de acción central.

Células T efectoras CD8+ en la inmunidad mediada por células

- Las células T citotóxicas se generan contra células (p. ej., infectadas por virus) que tienen un péptido de origen intracelular asociado con la moléculas de clase I del CMH de superficie. Producen la muerte mediante gránulos líticos que contienen perforina y o por el mecanismo a través del Fas-ligando Fas.
- Los LTC contienen lisosomas modificados equipados con una batería de proteínas citotóxicas, denominadas en conjunto como gránulos citotóxicos. El mecanismo hacia la apoptosis dependiente de los gránulos está orquestado por la granzima B, una serinproteasa que puede procesar y activar la proteína que determina la permeabilidad de la mitocondria, Bid, así como miembros de la familia caspasa de las proteasas de muerte celular. La granzima A también cumple una función importante en la muerte dependiente de gránulos.
- La muerte dependiente de Fas se produce a través de la caspasa 8, que produce la destrucción de una manera muy similar a la granzima B mediante la activación en cascada de las caspasas que entonces coordinan la muerte de la célula en la forma de apoptosis.
- La activación de la caspasa coordina la muerte de la célula diana desde el interior. Tras la activación, las caspasas escinden literalmente cientos de proteínas celulares para coordinar la apoptosis.
- Las células apoptósicas son eliminadas con rapidez a través de la fagocitosis como resultado de la aparición de cambios en la membrana que permite la fagocitosis para reconocer y eliminar de manera selectiva estas células.

La proliferación y la maduración de las respuestas de las células B están mediadas por citocinas

- La proliferación temprana está mediada por la IL-4, que también colabora con la síntesis de IgE.
- Los productores de IgA están impulsados por TGFβ e IL-5.
- La IL-4 más la IL-5 promueven la IgM y las IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 más el IFNγ estimulan la síntesis de IgG.

Acontecimientos en el centro germinativo

- Hay expansión clonal, cambio de isotipo y mutación en los centroblastos de la zona oscura.
- Los centroblastos de las células B mueren por apoptosis, a menos que sean rescatados por ciertas señales que sobreexpresan *bcl-2*. Éstas implican los entrecruzamientos con la Ig de superficie por complejos sobre las células dendríticas foliculares y la ocupación del receptor CD40 que impulsa a la célula hacia el compartimiento de memoria.
- La selección de mutantes por el antígeno guía el desarrollo de células B de alta afinidad.

Síntesis de anticuerpos

- El RNA para las regiones variable y constante sufre un proceso de corte y empalme antes de abandonar el núcleo.
- El corte y empalme diferencial permite la coexpresión de IgM e IgD con regiones V idénticas sobre una sola célula y el cambio de una IgM unida a la membrana a una secretada.

El cambio de clase de IgG se produce en las células B individuales

- La IgM producida en las fases tempranas de la respuesta cambia a IgG, sobre todo con los antígenos timodependientes. El cambio se encuentra en gran parte bajo control de las células T.
- Las respuestas de IgG, pero no de IgM, mejoran por la exposición secundaria. Afinidad de los anticuerpos durante la respuesta inmunitaria.

Afinidad del anticuerpo durante la respuesta inmunitaria

- Las dosis bajas de antígeno tienden a seleccionar células B de alta afinidad y, por lo tanto, anticuerpos puesto que sólo éstos pueden ser rescatados en el centro germinativo.
- Por las mismas razones, la afinidad madura a medida que disminuye la concentración del antígeno durante una respuesta inmunitaria.

Células de memoria

- Con la desaparición de la fuente de antígeno que inició su producción, la inmensa mayoría de los linfocitos efectores es eliminada por medio de la apoptosis. Se mantiene una fracción de células que responde al antígeno, posiblemente las que presentan mayor afinidad para éste, la cual forma el compartimiento de memoria.

- La apoptosis activada por linfocitos efectores se produce en gran medida por la vía dependiente de Fas- Fas ligando. FasL puede ser provista de una manera autocrina o paracrina.
- La división asimétrica de los linfocitos activados puede contribuir a la generación de células de memoria versus células efectoras a través de la distribución desigual de los determinantes del destino celular que influyen en la diferenciación ulterior.
- Las células T murinas de memoria pueden mantenerse en ausencia de antígeno, pero las humanas pueden requerir la reestimulación periódica con el antígeno.
- Los inmunocomplejos en la superficie de las células dendríticas foliculares de los centros germinativos proporcionan una fuente duradera del antígeno.
- Las células de memoria tienen mayor afinidad que las células vírgenes, en el caso de las células B por medio de mutación somática y en el caso de las células T por medio de la proliferación selectiva de células con receptores de mayor afinidad y mediante la sobreexpresión de moléculas asociadas, como CD2 y LFA-1, que aumentan la avidez (afinidad funcional) por la célula presentadora de antígeno.
- Las células T de memoria activadas y vírgenes se distinguen por la expresión de isoformas de CD45, en las que las primeras tienen el fenotipo CD45RO y las segunda CD45RA. Es probable que una proporción de la población CD45RO se revierta a una dotación de CD45RA de células de memoria en reposo. Las células de memoria CD45RA⁻ pueden dividirse en centrales CCR7⁺ y efectoras CCR7⁻.
- Los niveles elevados de expresión de CD44 también son característicos de las células T de memoria, y la expresión de bajo nivel se asocia con células T vírgenes.
- CD44 puede participar en la generación de memoria a través de señales antagonistas dependientes de Fas para la apoptosis.
- La IL-7 parece ser crítica para la supervivencia a largo plazo de las poblaciones de células T CD4 y está unida de modo preferente a las células T en reposo. Las células T de memoria CD8 requieren IL-15 para su supervivencia a largo plazo.

LECTURAS ADICIONALES

Barnes M.J. & Powrie F. (2009) Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. Immunity 31, 401–411.
Batista F.D. & Harwood N.E. (2009) The who, how and where of antigen presentation to B cells. Nature Reviews Immunology 9, 15–27.
Beverly P.C.L. (2004) Kinetics and clonality of immunological memory in humans. Seminars in Immunology 16, 315–321.
Bradley L.M., Haynes L. & Swain S.L. (2005) IL-7: maintaining T-cell memory and achieving homeostasis. Trends in Immunology 26, 172–176.
Camacho S.A., Kosco-Vilbois M.H. & Berek C. (1998) The dynamic structure of the germinal center. Immunology Today 19, 511–514.
Cullen S.P. & Martin S.J. (2008) Mechanisms of granule-dependent killing. Cell Death and Differentiation 15, 251–62.
Fazilleau N. et al. (2009) Follicular helper T cells: lineage and location. Immunity 30, 324–335.
Fujimoto M. & Naka T. (2003) Regulation of cytokine signaling by SOCS family molecules. Trends in Immunology 24, 659–666.
Kapsenberg M.L. (2003) Dendritic cell control of pathogen-driven T-cell polarization. Nature Reviews Immunology 3, 984–993.
Kinoshita K. & Honjo T. (2000) Unique and unprecedented recombination mechanisms in class switching. Current Opinion in Immunology 12, 195–198.
Korn T., Bettelli E., Oukka M. & Kuchroo V.K. (2009) IL-17 and Th17 Cells. Annual Review of Immunology 27, 485–517.
Lanzavecchia A. & Sallusto F. (2002) Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. Nature Reviews Immunology 2, 982–987.
Littman D.R. & Rudensky AY. (2010) Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. Cell 140, 845–58.
Mills K.H.G. (2004) Regulatory T-cells: friend or foe in immunity to infection? Nature Reviews Immunology 4, 841–855.
Mitchell D.M. & Williams M.A. (2010) An activation marker finds a function. Immunity 32, 9–12.
Moser B. & Loetscher P. (2001) Lymphocyte traffic control by chemokines. Nature Immunology 2, 123–128.
O'Garra A. & Murphy K.M. (2009) From IL-10 to IL-12: how pathogens and their products stimulate APCs to induce TH1 development. Nature Immunology 10, 929–932.
O'Shea J.J. & Paul W.E. (2010) Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. Science 327, 1098–1102.
Sallusto F., Mackay C.R. & Lanzavecchia A. (2000) The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. Annual Review of Immunology 18, 593–620.
Schluns K.S. & Lefrançois L. (2003) Cytokine control of memory T-cell development and survival. Nature Reviews Immunology 3, 269–279.
Shuai K. & Liu B. (2003) Regulation of JAK–STAT signalling in the immune system. Nature Reviews Immunology 3, 900–911.
Sprent J. & Surh C.D. (2001) Generation and maintenance of memory T-cells. Current Opinion in Immunology 13, 248–254.
Strasser A., Jost, P.J. & Nagata S. (2009) The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. Immunity 30, 180–92.
Taylor R.C., Cullen S.P. & Martin S.J. (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. Nature Reviews Molecular Cell Biol. 9, 231–241
Trinchieri G. (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. Nature Reviews Immunology 3, 133–146.
Wing K. & Sakaguchi S. (2010) Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. Nat Immunol. 11, 7–13.
Zlotnik A. & Yoshie O. (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity 12, 121–127.



CAPÍTULO 10
Mecanismos de control

Conceptos clave

A modo de resumen...

Las células inflamatorias y fagocíticas muy específicas de la respuesta innata necesitan migrar al sitio de la infección. Los linfocitos de la respuesta adaptativa tienen que proliferar en los tejidos linfoides secundarios organizados (los ganglios linfáticos, el bazo y los tejidos linfoides asociados a la mucosa) para generar cantidades suficientes de células específicas para el antígeno. Las células T deben ser activadas por las células presentadoras de antígeno profesionales; la mayoría de las respuestas de células B requieren la colaboración de las células T que tienen especificidad por el mismo antígeno. Existen varios niveles de control para asegurar que estas respuestas sean adecuadas, tanto desde el punto de vista tanto cuantitativo como del cualitativo.

Introducción

Al entrar en contacto con un agente infeccioso proliferan las células adecuadas específicas para el antígeno de la respuesta inmunitaria adquirida, a menudo formando una proporción considerable de linfocitos en los tejidos linfoides locales. Sin embargo, es crucial que este proceso no sea excesivo, ya que esto podría conducir a una respuesta inmunitaria que cause daño considerable a nuestros propios tejidos. Además, es importante que las respuestas sólo se produzcan como reacción contra agentes patógenos extraños y que, una vez que el patógeno haya sido eliminado, el sistema inmunitario vuelva a su estado de reposo. Tiene sentido que el **antígeno sea un factor regulador central** y que las respuestas linfocíticas sean dirigidas por la presencia de una infección, las que disminuirían en intensidad a medida que se elimina el agente patógeno (Figura 10.1).

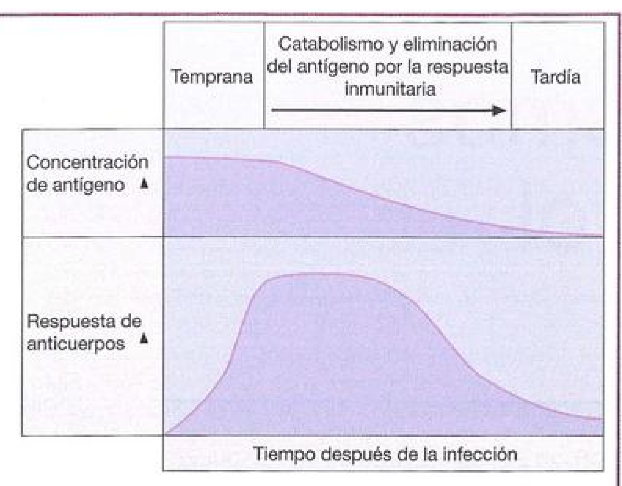


Figura 10.1. El antígeno dirige la respuesta inmunitaria.

A medida que disminuye la concentración de antígeno debido al catabolismo y la eliminación por los anticuerpos, declina la intensidad de la respuesta inmunitaria, pero se mantiene durante cierto tiempo en un nivel inferior por el antígeno atrapado en las células dendríticas foliculares del centro germinativo.

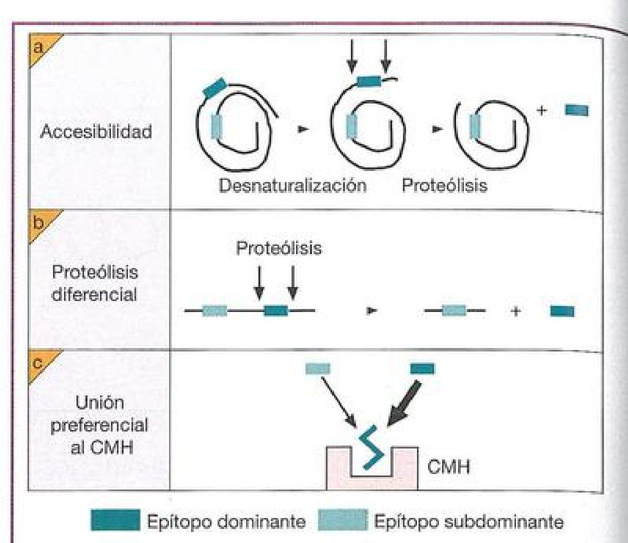


Figura 10.2. Mecanismos de dominancia del epítopo en el nivel del CMH.

Hay una jerarquía clara de epítopos respecto de la unión competitiva sobre la base de: a) la accesibilidad diferencial a las proteasas cuando se despliega la molécula; b) la presencia o la ausencia de secuencias particulares de aminoácidos que constituyen sitios sensibles para la proteasa; y c) la afinidad relativa de péptidos generados para el CMH. Así, los epítopos dominantes **ocupan** la mayor parte de las hendiduras disponibles del CMH, los epítopos subdominantes tienen menos éxito, los epítopos crípticos generan concentraciones extremadamente bajas de péptido-CMH que son ignoradas por las células T vírgenes potencialmente reactivas. El otro factor que puede influir en la dominancia es la disponibilidad de células T reactivas; si éstas fueron eliminadas, por ejemplo, mediante la inducción de la tolerancia por autoantígenos reactivos cruzados, un péptido que puede haber dominado la hendidura del CMH sería incapaz de provocar una respuesta inmunitaria.

Los antígenos pueden interferir entre sí

La presencia de un antígeno determinado en una mezcla de antígenos puede disminuir en forma drástica la respuesta inmunitaria contra los otros. Esto sucede incluso en los epítopos dentro de una molécula dada; por ejemplo, ciertos epítopos dentro de la región pre-S2 del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B son muy inmunógenos, mientras que otros sólo inducen respuestas inmunitarias relativamente débiles. Está claro que la posibilidad de que ciertos antígenos en una mezcla, o epítopos particulares en un antígeno, puedan poner en peligro una respuesta inmunitaria protectora deseada tiene implicaciones en el diseño de vacunas. Los factores que determinan la inmunodominancia son la frecuencia de precursores de las células B y T con receptores para diferentes epítopos sobre el antígeno, la afinidad relativa de los receptores de las células B para sus epítopos respectivos, el grado en el cual el anticuerpo de la membrana de superficie protege al epítopo de la proteólisis tras la endocitosis del complejo anticuerpo-antígeno por la célula B y la capacidad de generar péptidos antigénicos procesados que tiene fuerte afinidad por la hendidura del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (Figura 10.2).

El complemento y los anticuerpos ayudan a regular las respuestas inmunitarias

Los mecanismos inmunitarios innatos suelen ser los primeros en entrar en escena, y la activación de la vía alternativa del complemento conduce al depósito de C3b y C3d sobre el microorganismo. Cuando la célula B reconoce los antígenos revestidos por C3d, el entrecruzamiento del receptor de la célula B (BCR) y el receptor para el complemento CD21, con su molécula transductora de señales asociada CD19, aumenta la activación de las células B (Figura 10.3a). La IgM y la IgG3 (que es producida relativamente temprano después del cambio de clase en muchas respuestas inmunitarias) también pueden aumentar la respuesta de anticuerpos de una manera dependiente del complemento y, por consiguiente, tal vez por un mecanismo similar, pero que implica la vía clásica de activación del complemento. Las otras subclases de IgG pueden incrementar no sólo la producción de anticuerpos, sino también las respuestas de células T CD4+ por medio de la unión de inmunocomplejos para la activación de FcγR como FcγRI, FcγRIIA y FcγRIII y el aumento resultante de la captación del antígeno y la presentación por las células dendríticas. Los anticuerpos IgE también pueden aumentar la producción de todos los isotipos de anticuerpo y favorecer las respuestas de células T CD4+. Aquí, el mecanismo implica a FcεRII (CD23), el receptor de baja afinidad para la IgE, y es probable que dependa del aumento de la presentación del antígeno por las células B.

Paradójicamente, los anticuerpos IgG de todas las subclases no sólo pueden estimular sino también inhibir la respuesta de anticuerpos. Un mecanismo por el cual se sabe que se produce para la mayoría de las subclases de IgG es por el entrecruzamiento del BCR con FcγRIIb, que, enton-

Figura 10.3. Los entrecruzamientos del receptor antigénico de IgM de superficie con el receptor para el complemento CD21 estimulan las células B, y con el receptor FcγRIIB1 del Fcγ las inhiben.

a) Tras la activación del complemento, C3d queda unido de manera covalente a la superficie microbiana. El receptor para el complemento CD21, que junto con su complejo de señalización asociado CD19-CD81-CD225 (Leu13) forma el correceptor de la célula B, se une a C3d. El antígeno recubierto por el complemento forma entrecruzamientos entre este complejo con la IgM de superficie (sIgM) del BCR, lo que conduce a la fosforilación de tirosina de CD19 y la unión consecutiva de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3-K), lo cual da como resultado la activación de la célula B. b) La molécula FcγRIIB1 tiene un motivo citoplasmático de inhibición de inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM), y tras los entrecruzamientos con la Ig de membrana, se fosforila y se une a la inositol polifosfato 5'-fosfatasa SHIP y, por esto, inhibe la activación de la célula B.

ces, proporciona una señal negativa mediante la supresión de la fosforilación de la tirosina de CD19 (Figura 10.3b). Sin embargo, la IgG3 murina, que no es reconocida por FcγRIIb, también puede inhibir la producción de anticuerpos. Además, la inhibición puede obtenerse mediante el empleo de fragmentos $F(ab')_2$ de IgG policlonal y se observa en ratones con desactivación génica que carecen de FcγRIIb.

Así, parece que el epítopo enmascarado por anticuerpos también puede inhibir las respuestas de anticuerpos al impedir que las células B reconozcan los epítopos pertinentes sobre el antígeno. De hecho, sería razonable si desde el principio, cuando la concentración y la afinidad del anticuerpo específico son bajas, hubiera estimulación de la respuesta, pero más tarde, ante un exceso de anticuerpos, la combinación del epítopo enmascarado y la retroalimentación negativa junto con la eliminación de antígeno por fagocitosis y digestión inhibieran la respuesta. Es probable que varias consideraciones, como la concentración del antígeno, la afinidad del anticuerpo, la especificidad del epítopo, la distribución de subclases y los niveles de expresión de FcγR, determinen si la IgG ejerce una función estimuladora o inhibidora durante el curso de una respuesta inmunitaria.

Muerte celular inducida por activación

Está claro que la eliminación del antígeno del organismo por el sistema inmunitario conduce a una inhibición de la proliferación de los linfocitos debido a la ausencia de señales a través del receptor para el antígeno. Sin embargo, aun en presencia del antígeno está limitado el potencial de proliferación excesiva por un proceso denominado muerte celular inducida por activación. Las células T, después de su activación, sobreexpresan receptores de muerte y sus ligandos (Figura 10.4a). Los receptores de muerte son miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF-R); entre ellos se encuentran TNFRI, Fas (CD95), TRAIL-R1 (receptor de muerte [*death receptor*] DR4) y TRAIL-R2 (DR5). Si los ligandos están presentes en las superficies celulares, pueden activar la apoptosis en células adyacentes. Sin embargo, a menudo son liberados de la superficie celular por proteasas, lo cual genera formas solubles que en algunos casos mantienen la actividad; por ejemplo, la versión soluble de TRAIL conserva la capacidad de señalización a través del receptor TRAIL-R1. Es probable que los ligandos solubles puedan mediar la muerte celular paracrina o autocrina *in vivo*, y parecen ser promisorios como agentes terapéuticos tumorales. La inducción de la apoptosis a través de los receptores de muerte comprende al comienzo la escisión de la cisteinproteasa inactiva procaspasa 8 y la formación de caspasa 8 activa (Figura 10.4a). Por último, esta vía de activación converge con la vía de apoptosis mitocondrial inducida por el estrés celular (Figura 10.4b) y ambas conducen a la activación en cadena de las caspasas efectoras.

Aunque las vías del receptor de muerte y mitocondrial son activadas por estímulos diferentes, ellas están interconectadas porque la caspasa 8 puede escindir al miembro Bid de la familia Bcl-2 para producir una forma truncada (tBid), que entonces activa Bax y conduce a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. Esto permite que moléculas proapoptósicas, como el citocromo *c*, sean liberadas del espacio entre las membranas externa e interna de las mitocondrias. Otros miembros de la familia Bcl-2, como Bcl-2 propiamente dicho y Bcl-x_L actúan como "guardianes" que inhiben la apoptosis no deseada a fin de evitar la estimulación de la permeabilización de la membrana externa.

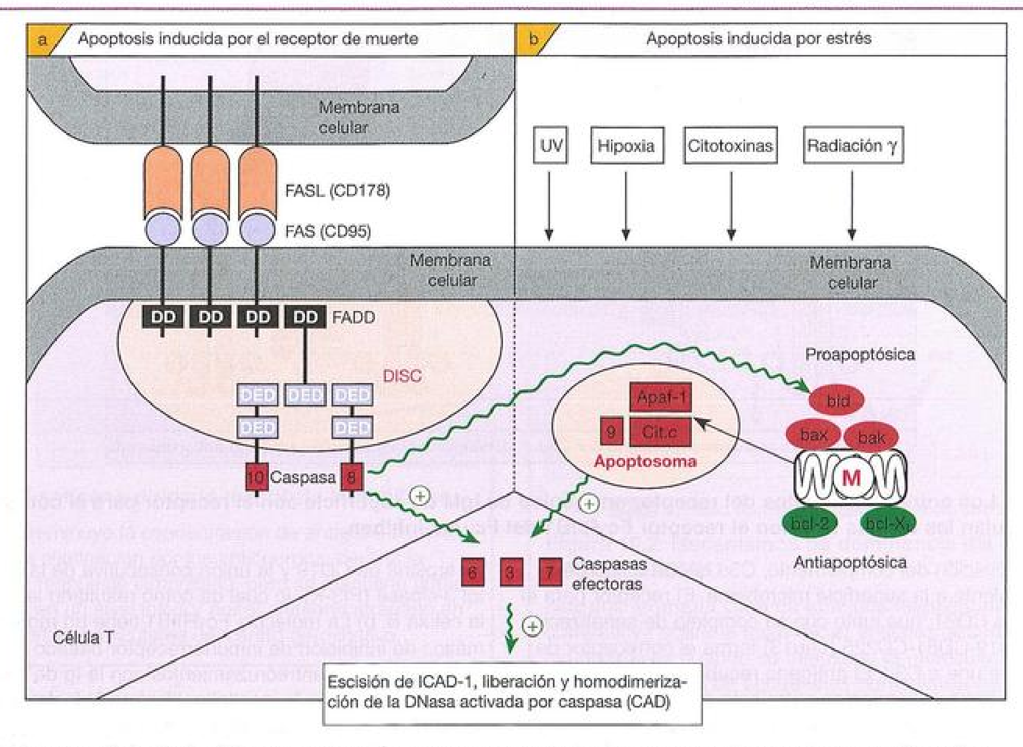


Figure 10.4. Muerte celular inducida por activación que comprende los receptores de muerte y sus ligandos.

a) La inducción de la apoptosis basada en el receptor comprende la trimerización de miembros de la familia TNF-R (p. ej., Fas) por ligandos trimerizados (p. ej., Fas-ligando). Esto reúne los dominios de muerte (DD; *death domains*) citoplasmáticos que pueden reclutar moléculas adaptadoras que contienen dominios efectores de muerte (DED; death effector domain) para formar el complejo de señalización inductor de muerte (DISC; *death-inducing signaling complex*). Los diferentes receptores utilizan distintas combinaciones de adaptadores que contienen DED; Fas utiliza FADD (dominio de muerte con proteína asociada con Fas). El DISC, que también incluye la caspasa 10, induce la escisión de la procaspasa 8 inactiva en caspasa 8 activa, con ulterior activación en cadena de las caspasas efectoras. Este proceso conduce por último a la escisión mediada por la caspasa 3 de la versión larga del inhibidor de la DNAasa activada por caspasa (ICAD-L). La escisión de ICAD-L da por resultado la liberación de CAD, que entonces se homodimeriza para formar la endonucleasa activa que escinde el DNA internucleosómico. b) Una segunda vía de inducción de apoptosis, a menudo desencadenada por estrés celular, comprende algunas proteínas asociadas con mitocondrias, como citocromo *c* y miembros proapoptósicos (Bax, Bak, Bid) y antiapoptósicos (Bcl-2, Bcl-XL) de la familia Bcl-2. La activación de la caspasa 9 es el fenómeno clave en esta vía y requiere la formación del complejo "apoptosoma" formado cuando se libera el citocromo *c* tras la permeabilización mediada por Bax- y Bak de la membrana externa de la mitocondria en respuesta a las señales proapoptósicas. Tras su asociación con el citocromo *c* y el cofactor Apaf-1, se activa la procaspasa 9 y escinde la procaspasa 3. M, mitocondria (véanse las Figuras 9.18 y 9.19).

De particular importancia en la muerte celular inducida por activación mediada por el receptor de muerte es la molécula FLIP, que existe en varias formas. La forma larga de FLIP ($FLIP_L$) tiene similitudes estructurales con la caspasa 8 y, en consecuencia, cuando se expresa en niveles elevados impide por inhibición competitiva el reclutamiento de esta caspasa en el complejo de señalización inductor de muerte (*death inducing signaling complex*, DISC). Así, las concentraciones de FLIP pueden determinar el destino de la célula cuando el receptor de muerte es ocupado por su ligando, pero no afecta la apoptosis inducida por la vía mitocondrial activada por el estrés (Figura 10.5).

Inmunorregulación por células T

Especialización de las células T *helper*

Hay abundantes pruebas para sugerir que las células T *helper* (Th) pueden dividirse en diferentes subpoblaciones, con actividades funcionales distintas, de acuerdo con las citocinas que ellas producen. Las tres subpoblaciones principales definidas hasta ahora son las células Th1 secretoras de IFNγ, las células Th2 secretoras de IL-4 y las células Th17 secretoras de IL-17. No se preocupe si olvida algo, porque, aunque también hay células denominadas como Th3 (véase más adelante), así como Th9 productoras de IL-9, no hay (¡aún!) ninguna otra célula Th con otros números hasta llegar a Th17. Sin embargo, aunque las células Th1 y Th2 son *"helper"* (colaboradoras), pueden ser consideradas como "supresoras" por el hecho de que ellas antagonizan mutuamente la actividad de la otra (Figura 10.6a). En realidad, es un tema recurrente en la inmunología que las células y las moléculas individuales pueden aumentar algunas respuestas e inhibir otras con el fin de mantener la homeostasis inmunitaria.

La subpoblación Th17 comparte con las célula T reguladoras Foxp3+ (Treg, como se describirá en breve) el hecho de que son inducidas por la citocina TGFβ. Sin embargo,

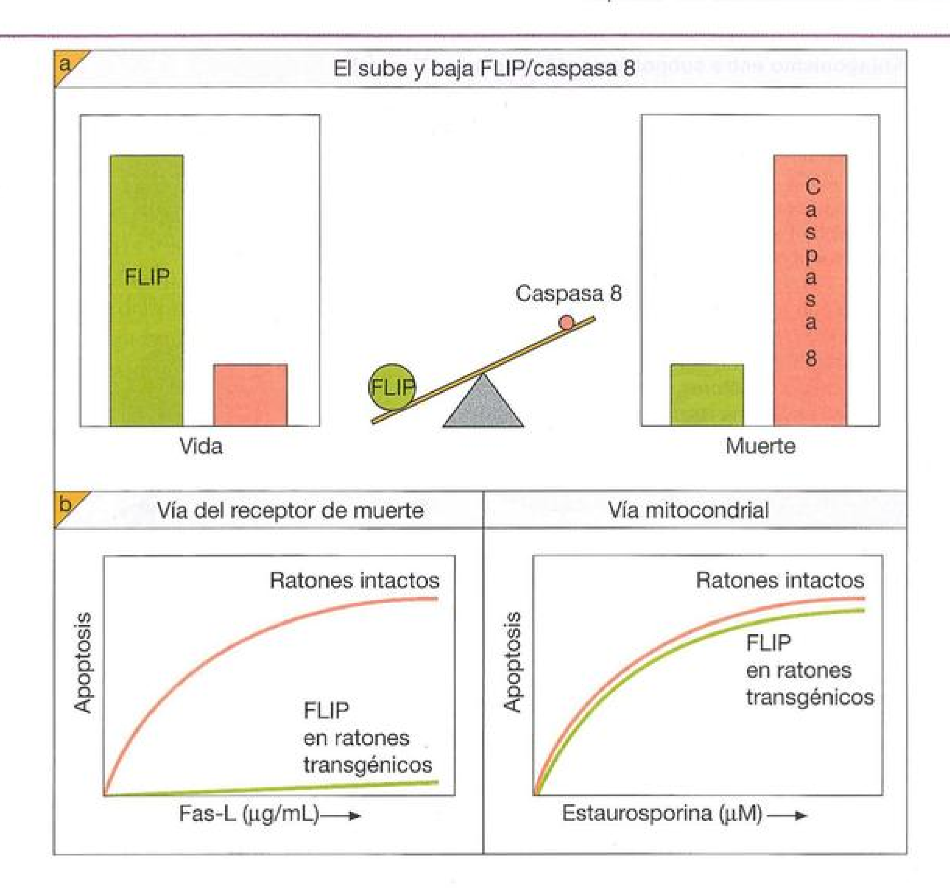


Figura 10.5. Decisiones de vida y muerte.

a) Las cantidades relativas de FLIP antiapoptósica y caspasa 8 proapoptósica pueden determinar el destino de la célula. b) Experimentos que comprenden la sobreexpresión de FLIP en ratones transgénicos indican que esta proteína protege a las células T de la muerte celular inducida por activación (MCIA) estimulada a través de la vía del receptor de muerte por Fas-ligando, pero no de la muerte celular desencadenada por la vía mitocondrial que utiliza el fármaco estaurosporina. (Basado en datos obtenidos por J. Tschopp y cols.)

las células Th17 sólo son inducidas cuando hay determinadas citocinas presentes (IL-1b, IL-23 o ambas en los seres humanos, IL-6, IL-21 o ambas en los ratones) y, por consiguiente, los precursores de las células T se diferenciarán en ya sea Treg (en presencia de TGFβ pero en ausencia de estas citocinas particulares) o células Th17, que conduce al menos en parte a una relación mutua entre estas dos poblaciones (Figura 10.6b). Esta situación es reforzada por la capacidad del factor de transcripción Foxp3 en las Treg de unirse al factor de transcripción RORγt, y por lo tanto inhibirlo, necesario para la actividad de la célula Th17. A diferencia de las células Treg, las células Th17 actúan más en promover la inflamación tisular.

Supresión mediada por las células T

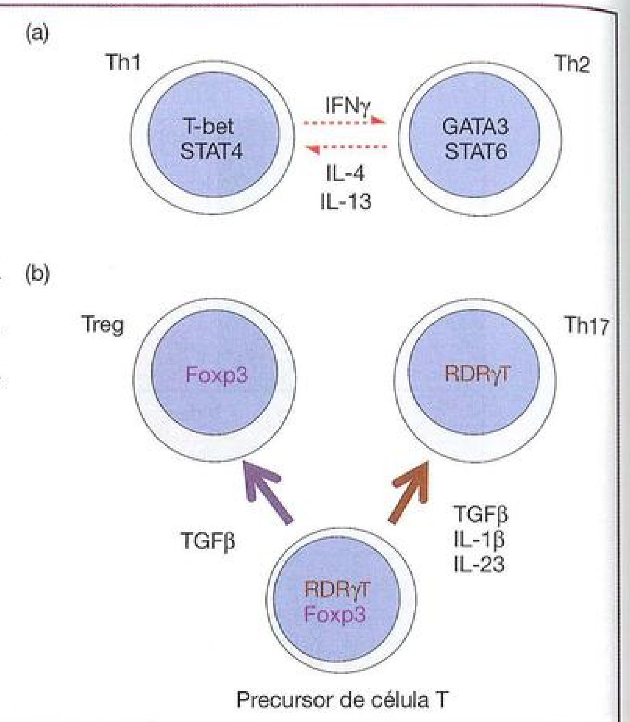
Tal vez sea inevitable que la naturaleza, al haber desarrollado un grupo funcional de células T que promueven respuestas inmunitarias, también deba desarrollar un conjunto regulador cuya tarea sea modular las células T *helper*. Los inmunólogos prestaron por primera vez seria atención a la fraternidad inmunitaria por un fenómeno, denominado de modo pintoresco "tolerancia infecciosa" por su descubridor, Dick Gershon. Causó mucha sorpresa la demostración de que, si se convertían ratones en no reactivos mediante la inyección de una dosis elevada de eritrocitos de carnero, sus células T suprimían la formación de anticuerpos específicos en los receptores normales a los cuales habían sido transferidos (Figura 10.7). Es posible que el lector no aprecie por qué este resultado fue completamente sorprendente, pero en ese momento la tolerancia inducida por antígenos era considerada en esencia un fenómeno negativo, que consistía en la depleción o el silenciamiento de clones más que en un estado de supresión activa. Con el correr de los años, se demostró que la supresión por las células T modula distintas respuestas humorales y celulares; en este último grupo se hallan la hipersensibilidad retardada, las células T citotóxicas y la proliferación de células T específicas para el antígeno. Sin embargo, la existencia de células T supresoras profesionales aplicadas es una cuestión que ha generado mucho debate.

Los epítopos supresores y helper *pueden ser distintos*

El análisis detallado de las respuestas murinas contra antígenos, como la lisozima de la clara del huevo de gallina,

Figure 10.6. Antagonismo entre subpoblaciones de células T.

a) Las células Th1 se generan bajo la dirección de la producción de IL-12 por las células dendríticas. Una vez producidas, pueden suprimir la generación de células Th2 mediante la secreción de la citocina IFNγ, que evita la expresión de los factores de transcripción GATA3 y STAT6 necesarios para el fenotipo Th2, mientras que la producción de IL-4 y IL-13 por las células Th2 limita la expresión de los factores de transcripción T-bet y STAT4 asociados con la actividad Th1. b) El factor de transcripción Foxp3 actúa de modo antagónico con el factor de transcripción RORγT requerido para la actividad Th17. Por esto, tenderán a dominar las células T reguladoras (Treg) Foxp3+ o las células Th17 RORγC dependiendo de cuál de estos dos factores de transcripción se expresa con mayor intensidad. En alguna medida, esto está controlado por el entorno local de citocinas.



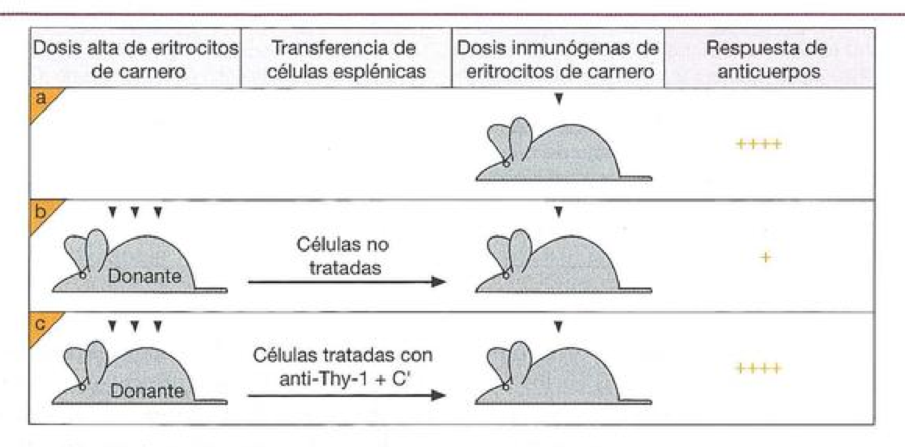


Figura 10.7. Demostración de células T supresoras.

a) Un ratón de una cepa apropiada inmunizado con una dosis inmunógena de eritrocitos de carnero elabora una respuesta intensa de anticuerpos. Sin embargo, cuando se transfieren inicialmente al animal singénico células de bazo de un donante de la misma cepa inyectado previamente con una dosis elevada de antígeno, aquéllas deprimen la respuesta de anticuerpos a una dosis normalmente inmunógena del antígeno. El efecto se pierde si las células esplénicas se tratan primero con un antisuero específico para las células T (anti-Thy-1) más complemento, lo cual revela que los supresores son las células T. (De Gershon R.K. y Kondo K. [1971], *Immunology* **21**, 903-914.)

revela que ciertos determinantes pueden evocar, según la cepa de ratón, respuestas supresoras muy intensas en lugar de respuestas de células T helper, y que las células T supresoras dirigidas contra un determinante pueden inactivar las respuestas de células *helper* y de anticuerpos contra otros determinantes en la misma molécula. Así, los ratones de haplotipo *H-2*^{b} responden de modo deficiente a la lisozima porque desarrollan supresión dominante; sin embargo, si se eliminan los tres aminoácidos N-terminales del antígeno, estos ratones generan una respuesta excelente, que muestra que la supresión por las células T dirigida contra el determinante asociado con la región N-terminal inactiva la respuesta a los otros determinantes del antígeno. Se han obtenido resultados similares en otros sistemas. Esto conduce a pensar que el antígeno en sí actúa como una forma de puente para permitir la comunicación entre células T reguladoras y células que reaccionan contra los otros determinantes, como podría suceder por la unión de esas células con una presentadora de antígenos que exprese sobre su superficie determinantes procesados distintos del mismo antígeno (Figura 10.8).

Características de la supresión

Originalmente, se encontró que las células T supresoras de ratones tienen en su superficie Ly2 (ahora denominado CD8a) y Ly3 (CD8b). Cuando los investigadores comenzaron a caracterizar estas células T supresoras CD8+, describieron que expresaban una molécula conocida como I-J, codificada dentro de la región del CMH y capaz de producir factores supresores solubles que a menudo eran específicos para el antígeno. ¡Resultó imposible definir desde el punto de vista bioquímico estos factores supresores, y cuando se clonó la totalidad del CMH se encontró que I-J no existía! Quizá no sorprenda, entonces, que por estas circunstancias siguiera un período de escepticismo extremo respecto de la existencia misma de las células T supresoras. Sin embargo, durante la última década hubo una recuperación notable, aunque ahora se aprecia que la mayoría de estas células pertenece al linaje de células T CD4 en lugar de CD8, y la moda actual es referirse a ellas como **células T reguladoras** (Treg). No obstante, su caracterización ha sido problemática y al parecer existen varios tipos diferentes de Treg. Aunque algunas requieren el contacto intercelular para ser supresoras, otras dependen de citocinas solubles para mediar su efecto.

Tanto las células T CD4+ como las CD8+ pueden suprimir las respuestas inmunitarias

Analicemos primero las células T supresoras CD8+. Un ejemplo experimental relaciona a la cepa de ratón B10.A (2R) que tiene una respuesta inmunitaria baja a la lactato deshidrogenasa β (LDHβ) asociada con la posesión del haplotipo k en lugar del b en el gen H-2Eβ. Las células linfoides obtenidas de estos animales tras la inmunización con LDHβ proliferan de manera deficiente *in vitro* en presencia del antígeno, pero si se eliminan las células CD8+, las células CD4+ restantes dan una respuesta mucho mayor. Al agregar de nuevo células CD8+ se reinstaura la supresión activa. Las células T supresoras humanas también pueden pertenecer a la subpoblación CD8. Por lo tanto, las células CD8+ CD28− pueden impedir que las células B presentadoras de antígeno sobreexpresen moléculas B7 coestimuladoras que conducen a la a la incapacidad de estas células B de inducir la colaboración de la célula T para la producción de anticuerpos.

Aunque de estos experimentos surge claramente que las células T CD8+ pueden mediar la supresión, el punto de vista actual es que las células Treg CD4+CD25+Foxp3+ son quizá los principales efectores de la supresión y pueden suprimir la actividad de las células T CD4+, las células T CD8+, las células dendríticas y las células B. Si se utiliza anti-CD25 y complemento para producir la depleción de las células CD25+ de los ganglios linfáticos o del bazo de ratones BALB/c y se transfieren luego las células CD25− restantes a ratones BALB/c atímicos ("desnudos"), los receptores desarrollan enfermedades autoinmunitarias múltiples. Sin embargo, si se administran células CD4+CD25+ poco después de las células CD25−, los ratones no desarrollan enfermedades autoinmunitarias, lo cual sugiere que la población CD4+CD25+ contiene Treg que anulan las células T autorreactivas. Muchos experimentos similares han establecido que las células T CD4+CD25+ incluyen en realidad una población de Treg capaz de mediar la supresión de la autoinmunidad, el rechazo de aloinjertos y las respuestas alérgicas. Sin embargo, como CD25 (la cadena α del receptor para IL-2) es un marcador general de la activación celular, no es posible usarla como una molécula que defina la subpoblación reguladora. En cambio, es su expresión de Foxp3 la que las define más estrechamente como células T reguladoras. Foxp3 es un factor de transcripción de la familia *"forkhead"* que controla la expresión de varios genes implicados en determinar el fenotipo supresor (Figura 10.9). De hecho, si se introduce el gen *Foxp3* en células T CD4+CD25− vírgenes, éstas se convierten en células capaces de suprimir la proliferación de células T (Figura 10.10). Estas células transfectadas que recientemente adquirieron Foxp3 son, al igual que las células T recién aisladas, capaces de proteger a los ratones contra el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias en diversos modelos animales.

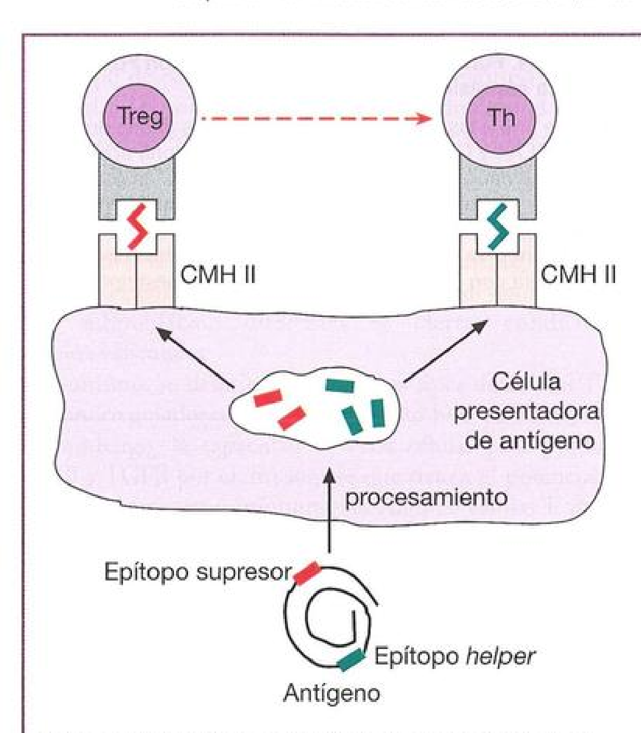


Figura 10.8. Mecanismo posible para explicar la necesidad de una relación física entre epítopos supresores y *helper*.

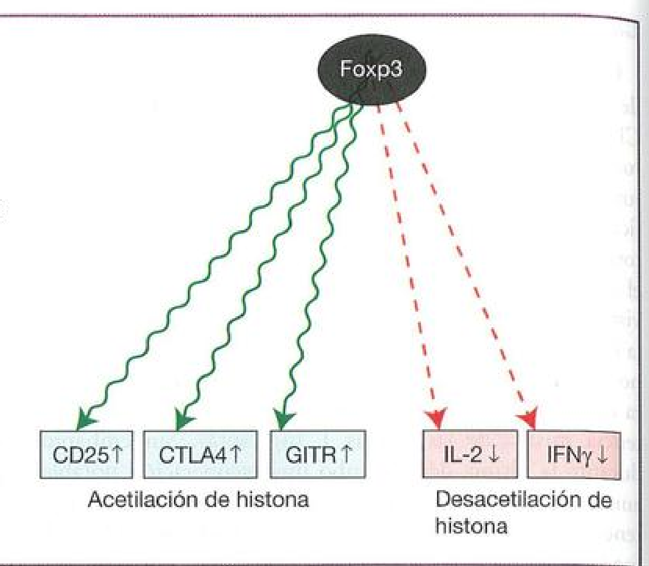
Las células *helper* (Th) y reguladoras/supresoras (Treg) pueden interactuar al unirse estrechamente sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno, que procesa el antígeno y muestra los diferentes epítopos sobre moléculas separadas del CMH en su superficie.

Las células Treg pueden aparecer en forma natural o ser inducidas por el antígeno

Las células Treg CD4+CD25+ comprenden dos poblaciones principales: las **Treg que aparecen de modo natural** (nTregs), que expresan Foxp3 a partir del momento en que

Figura 10.9. Función del factor de transcripción Foxp3 en mediar la supresión.

Foxp3 se une a las regiones promotoras de los genes de CD25, CTLA4 y GITR y recluta las enzimas histona acetiltransferasas que causan la acetilación de las histonas en esa zona del DNA y, así, facilita la activación de la transcripción génica. Sin embargo, cuando Foxp3 se une a los promotores asociados con los genes de IL-2 y de IFNγ recluta las enzimas histona desacetilasa con la represión resultante de la transcripción génica.



(a)

LTR — Foxp3 IRES GFP — LTR

LTR — IRES GFP — LTR

Vector que contiene Foxp3

CD4+ CD25-

Vector (control negativo)

CD4+ CD25-

Células CD25+ (control positivo, no transfectado)

CD4+ CD25+

Agregar

o

o

Medir la proliferación después del cocultivo

Células CD4+ CD25- recién aisladas más anti-CD3 y CPA

(b)

Células agregadas

Proliferación

CD4+ CD25+ vector control

CD4+ CD25- + Foxp3

CD4+ CD25+

Cantidad de células agregadas al cocultivo

Figura 10.10. La adquisición de Foxp3 confiere actividad reguladora a las células T.

a) Se introdujo el gen *Foxp3* a un vector retroviral compuesto de repeticiones terminales largas 5' y 3' (LTR), un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES, *internal ribosome entry site*) y proteína fluorescente verde (GFP, *green fluorescent protein*). Este constructo, o vector sin Foxp3, fue luego transfectado en células CD4+CD25- (que se sabe carecen de actividad de célula T reguladora). Se agregaron cantidades variables (hasta $2,5 \times 10^4$) de las células T transfectadas, o de células Treg CD4+CD25+ recientemente aisladas no transfectadas (como control positivo, rojo), a un cultivo de $2,5 \times 10^4$ células CD4+CD25- recientemente aisladas estimuladas con un anticuerpo monoclonal anti-CD3 en presencia de células presentadoras de antígeno. b) La proliferación (medida por la incorporación de TdR marcado con ^{3}H) fue inhibida por las células T CD25 transfectadas con Foxp3 en una magnitud comparable a la observada con las células Treg CD4+CD25+ recientemente aisladas, lo que indica que Foxp3 confiere actividad supresora a las células T. (Basado en Hori S., Nomura T. y Sakaguchi S. [2003], *Science* **299**, 1057-1061.)

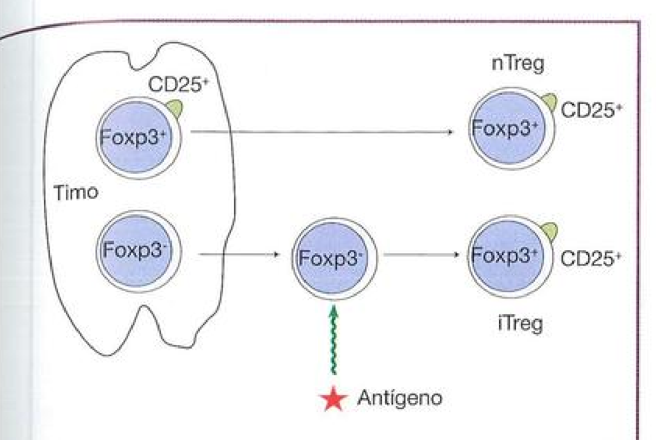


Figura 10.11. Células T reguladoras que aparecen en forma natural e inducible.

Las células T reguladoras que aparecen en forma natural (nTregs) ya expresan Foxp3 y CD25 una vez que se convierten en maduras en el timo y pueden actuar de inmediato para suprimir respuestas inmunitarias una vez que ingresan en la periferia. Por el contrario, las células T reguladoras inducibles (iTreg) inicialmente no expresan Foxp3 ni CD25 y carecen de la capacidad de suprimir las respuestas inmunitarias. Sin embargo, ellas pueden convertirse en Treg Foxp3+CD25+ funcionales después de la estimulación por el antígeno en los tejidos linfoides secundarios.

son producidas en el timo, y las **Treg inducibles** (iTregs), que se originan en la periferia a partir de precursores CD4+CD25− y expresan Foxp3 y CD25 tras la activación (Figura 10.11). Las Treg que aparecen de modo natural también expresan CTLA-4, OX40, GITR (molécula relacionada con la familia del receptor TNF inducida por glucocorticoides), selectina L y TGFβ de la superficie celular. La activación de estas células suele ser específica para el antígeno, pero con posterioridad pueden suprimir las respuestas a otros antígenos, situación conocida como supresión vinculada (*linked supression*). Aún debe establecerse el mecanismo preciso que utilizan para suprimir las respuestas inmunitarias contra el antígeno iniciador o contra otros antígenos, pero suele requerir el contacto intercelular entre la célula reguladora y la célula regulada. Los mecanismos propuestos comprenden la apoptosis mediada por perforina/granzima de la célula T regulada, la interacción de la galactina-1 en la superficie de la Treg con su receptor sobre la célula T regulada que conduce a la detención del ciclo celular o la interferencia con la activación de las células dendríticas. Algunas Treg inducidas tienen un fenotipo muy similar y también se considera que suprimen por medio de mecanismos dependientes del contacto.

También existen otros tipos de células supresoras/reguladoras

También se han descrito otros tipos de células T reguladoras que no requieren el contacto intercelular. Así, las células CD4 humanas estimuladas con el antígeno en presencia de IL-10 pueden evolucionar a células Tr1 CD25+CTLA-4+GITR+Foxp3+ que secretan por sí IL-10, una citocina capaz de mediar las funciones inmunosupresoras (Figura 10.12). Otro tipo de población de iTreg con un fenotipo similar a las células Tr1 son las células Th3, que están definidas por el hecho de que secretan TGFβ, otra citocina con capacidad inmunosupresora. Debe señalarse que las diferentes subpoblaciones de células T CD4+ (Treg, Th1, Th2, Th17, etc.) pueden no estar obligadas a permanecer como ese tipo celular durante toda su vida, y que, por consiguiente, una célula que pertenece a una subpoblación puede convertirse a una subpoblación diferentes en ciertas condiciones medioambientales.

Asimismo, se describieron distintos tipos de células T γδ inmunorreguladoras, pero aún no están bien caracterizadas. Sin embargo, la capacidad de estas células para producir IL-10 y TGFβ por cierto sugiere que tienen el potencial de inhibir las respuestas inmunitarias. Algunas células T γδ son Foxp3+ y, a pesar de que secretan cantidades sustanciales de TGFβ suprimen la proliferación de las células T por un mecanismo dependiente del contacto celular. Otro tipo de célula potencialmente reguladora es la NKT, que tener un TCR invariable, responde al glucolípido sintético α-galactosilceramida presentado por CD1d y puede producir la citocina interferón γ (IFNγ) de Th1y la citocina IL-4 de Th2.

Recientemente, varios estudios mostraron que las poblaciones de granulocitos y monocitos que pueden inhibir la activación de células T están presentes en situaciones patológicas como el cáncer, las infecciones crónicas, la inflamación, los traumatismos, la sepsis y el trasplante. Estas **células supresoras mieloides** pueden afectar directamente la señalización a través del receptor de la célula T y también puede inducir células Treg Foxp3+. Su función, si hay alguna, en la regulación fisiológica normal de las respuestas inmunitarias es algo hasta ahora poco claro. Sin embargo, es posible que después de la infección estas células supresoras aparezcan en forma transitoria como parte de la diferenciación normal en células mieloides maduras (no supresoras). Estas células con actividad supresora mieloide transitoria pueden limitar la inmunopatología mediada por células T que, de otro modo, podrían causar daño excesivo al huésped.

Es de esperar que las investigaciones en curso ayuden a aclarar las funciones de los diferentes tipos de células supresoras/reguladoras.

En la Figura 10.13 se resumen algunos de los principales factores que controlan la respuesta inmunitaria.

Redes idiotípicas



Hipótesis de la red de Jerne

En 1974, Neils Jerne, laureado con el Premio Nobel, publicó un trabajo titulado *Hacia una teoría de red del sistema inmunitario*, en el que propuso que las estructuras formadas por las regiones variables de anticuerpos (es decir, el idiotipo del anticuerpo) podrían reconocer otras regiones variables del anticuerpo de tal manera que formarían una red basada en las interacciones mutuas idiotipo-antiidiotipo. Puesto que las células B utilizan la molécula de anticuer-

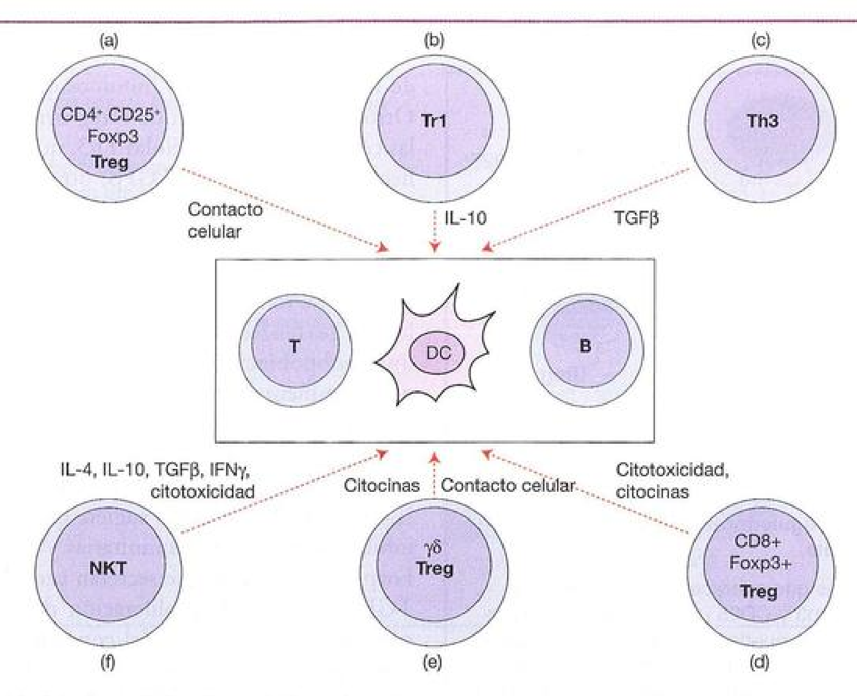


Figura 10.12. Diversidad de las células T reguladoras/supresoras.

Se describieron varios tipos diferentes de células T reguladoras/supresoras que pueden actuar, en magnitudes variables, para inhibir las células T, las células B y las células dendríticas efectoras. Comprenden: a) las Treg inducidas que aparecen en forma natural, ya descritas, que en general suprimen mediante mecanismos que requieren el contacto intercelular; b) células Tr1 que secretan IL-10; c) células Th3 que secretan TGFβ; d) células CD8 que pueden suprimir mediante citotoxicidad o citocinas; e) células T inmunosupresoras que portan TCR γδ; y f) células NKT en los que se han propuesto modos de actividad mediados por citocinas y citotoxicidad.

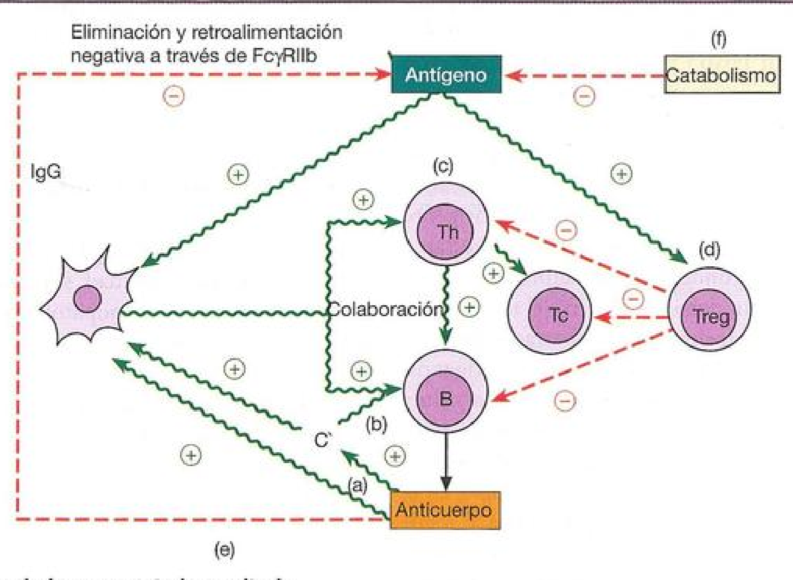


Figura 10.13. Regulación de la respuesta inmunitaria.

a) Los anticuerpos pueden estimular respuestas inmunitarias al recubrir el antígeno para aumentar la captación de las células presentadoras de antígeno profesionales que poseen moléculas de clase II del CMH y el procesamiento y ulterior presentación a las células T *helper*, mediante la formación de complejos Ac-Ag que se unen a receptores Fc sobre las células dendríticas foliculares para la presentación del antígeno intacto a las células B, y mediante la activación del complemento por medio de la vía clásica y, por consiguiente, la generación de C3b, que actúa como una opsonina, y C3d b), que participa en la coestimulación de la célula B. Las células T *helper* c) proporcionarán colaboración para la activación de las células B y las células T citotóxicas. En ciertas circunstancias, el antígeno estimulará de modo preferencial a las células T reguladoras/supresoras d), que inhibirán las respuestas de células T y B. Además de activar la respuesta, los anticuerpos también pueden inhibir las respuestas inmunitarias e) al facilitar la eliminación del antígeno del cuerpo, mediante el enmascaramiento de epítopos, y, por los anticuerpos IgG, por retroalimentación negativa a través del FcγRIIb en las células B. El catabolismo f) del antígeno sea por la respuesta inmunitaria exitosa o por los procesos de degradación normal del cuerpo también conduce claramente a la pérdida de la estimulación del sistema inmunitario.

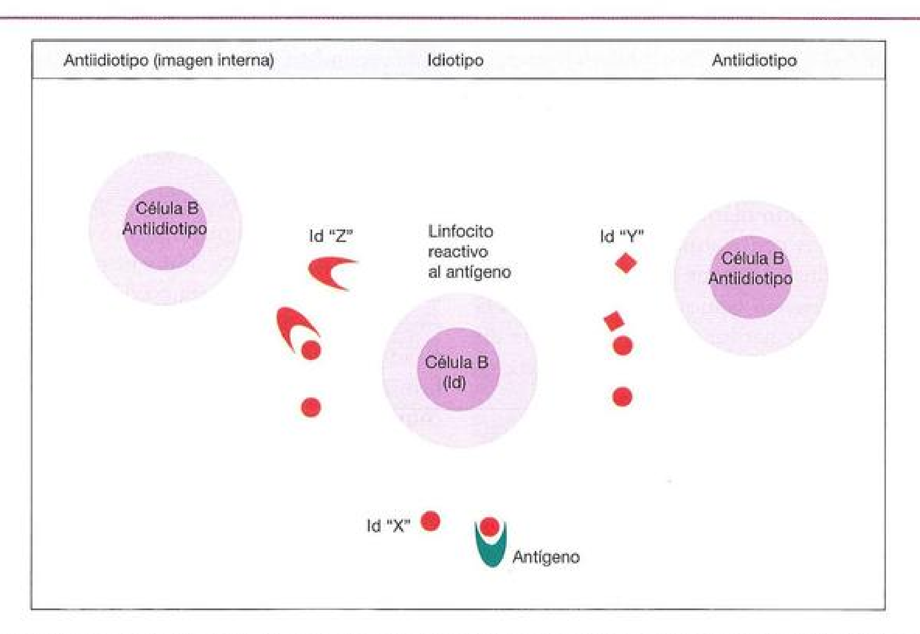


Figura 10.14. Las regiones variables del receptor para el antígeno conectan los linfocitos por medio de interacciones idiotípicas.

Los idiotipos (Id) son en esencia "formas" generadas por plegamiento de secuencias de aminoácidos en la región variable del receptor para el antígeno. Los receptores de un linfocito tienen la posibilidad de reconocer en forma recíproca un idiotipo sobre los receptores de otro linfocito si las dos formas "encajan", como sucede con la unión anticuerpo-antígeno convencional. Aunque éstas son interacciones mutuas entre dos idiotipos diferentes, uno de estos idiotipos se denominará como antiidiotipo y el otro como idiotipo. En la práctica, ambos son idiotipos y, simultáneamente, ambos son antiidiotipos, ¡un ejemplo excelente del acertijo de la gallina y el huevo! La interacción a través del reconocimiento idiotipo-idiotipo puede potencialmente conducir a la estimulación o la supresión de la actividad del linfocito. También son posibles las interacciones célula B-célula B, célula B-célula T y célula T-célula T. Por ejemplo, las interacciones célula T-célula T pueden suceder a través del reconocimiento directo de un receptor de la célula T (TCR) por el otro, o más común por el reconocimiento de un péptido procesado del TCR asociado con el CMH. Dentro de las muchas estructuras "antiidiotipo" diferentes posibles, algunas pueden, por azar, poseer un idiotipo de forma similar al antígeno (es decir, proporcionar una **imagen interna**, representada por una de sus propias moléculas, de una estructura encontrada en el mundo externo; por ejemplo, un antígeno sobre un patógeno). Esta situación se ilustra mediante el idiotipo "Z" a la izquierda de la figura que no sólo reconoce el idiotipo "X" específico del antígeno sino que también posee una estructura similar a la del antígeno que es reconocido por el Id "X". El idiotipo "Y" a la derecha de la figura también reconoce el idiotipo "X", pero no posee similitud alguna con el antígeno. Obsérvese que los receptores de diferente especificidad antigénica puede a veces poseer el mismo idiotipo (estos se conocen como idiotipos de reacción cruzada) y que la red puede ser mucho más amplia que la ilustrada en la figura con anti-anti-Id, anti-anti-anti-Id y así sucesivamente.

po como su receptor para el antígeno, esto proporcionaría una conexión entre clones diferentes de células B y, por consiguiente, la posibilidad de la regulación de los clones que son miembros de la red (Figura 10.14). Más adelante, este concepto se extendió para incluir los idiotipos presentes en los receptores de las células T tanto $CD4^+$ como $CD8^+$. No hay duda de que los elementos que pueden formar una red idiotípica están presentes en el organismo, y que en el trascurso de las respuestas inducidas por antígenos se producen autoantiidiotipos. Por ejemplo, ciertas cepas de ratones a los que se inyectaron vacunas antineumocócicas generan una respuesta de anticuerpos contra los grupos fosforilcolina en los cuales domina el idiotipo T15 codificado por la línea germinal. Se pueden demostrar ondas de células $T15^+$ y anti-T15 (es decir, autoantiidiotipo). Mediante distintos sistemas experimentales, también se demostró reactividad antiidiotípica en poblaciones de células T. En efecto, las células T antiidiotípicas que reconocen péptidos derivados de las regiones CDR2, CDR3 y de las regiones estructurales de otros TCR parecen formar parte del repertorio normal de las células T humanas. Entre los inmunólogos, aún es tema de debate la magnitud con la cual las interacciones antiidiotípicas contribuyen a la regulación de las respuestas inmunitarias, pero claramente existe el potencial para que estas interacciones estimulen e inhiban los linfocitos que contribuyen a la red.

Antiidiotipos de imagen interna

Dada la existencia casi infinita de secuencias de aminoácidos y, por lo tanto, las estructuras que pueden ser generadas dentro de las regiones variables de anticuerpos, no es demasiado sorprendente que en ocasiones un antiidiotipo tenga una forma similar a la de un antígeno. En consecuencia, estos anticuerpos pueden a veces proporcionar una "**imagen interna**" de un antígeno externo en el que un componente de nuestro propio cuerpo (el antiidiotipo) se asemeja a una estructura del antígeno extraño (Figura 10.14).

Como se sabe que en condiciones adecuadas el anti-Id puede utilizarse como "antígeno" para estimular la producción de anticuerpos, podría ser posible utilizar anti-Id monoclonales de imagen interna como antígenos "sustitutos" para la inmunización los casos en que es difícil obtener antígenos en grandes cantidades (por ejemplo, antígenos provenientes de parásitos como filarias o los antígenos embrionarios débiles asociados con algunos tipos de cáncer). Otro ejemplo es cuando los antígenos proteicos obtenidos por síntesis química o clonación génica no se pliegan en la configuración de la molécula nativa; esto no representa un problema con el anti-Id, que por definición ha sido seleccionado para tener la forma del epítopo antigénico.

Influencia de los factores genéticos

Algunos genes afectan la capacidad de respuesta general

Biozzi y cols. mostraron que los ratones se pueden cruzar en forma selectiva para desarrollar respuestas altas o bajas de anticuerpos a lo largo de varias generaciones con el fin de obtener dos líneas, una de las cuales produce de modo constante altos títulos de anticuerpos contra distintos antígenos, y la otra, títulos relativamente bajos (Figura 10.15). Alrededor de los diez locus genéticos que participan, algunos influyen en la proliferación y diferenciación de las células B, mientras que otros afectan el comportamiento de las células dendríticas y de los macrófagos.

Los genes de los receptores antigénicos están relacionados con la respuesta inmunitaria

Sin duda, los genes para Ig y *V, D* y *J* de TCR, que codifican los sitios de reconocimiento específicos de los receptores antigénicos de los linfocitos, tienen una importancia fundamental en la respuesta inmunitaria adquirida. Sin embargo, como los mecanismos que desarrollan una diversidad de receptores a partir de los genes disponibles son muy firmes, es improbable que se produzca inmunodeficiencia como resultado de un escaso repertorio de genes de regiones variables de Ig o de TCR. No obstante, sólo en ocasiones observamos brechas ("agujeros") en el repertorio debido a la falta de un gen; la ausencia de respuesta al polímero glucídico α1-6 dextrano es una característica de los animales sin un gen $V\alpha_2$ de inmunoglobulina; los ratones que carecen del gen $V\alpha_2$ del TCR no pueden montar una respuesta de células T citotóxicas contra el antígeno masculino H-Y.

Las respuestas inmunitarias son influidas por el CMH

Hubo mucha expectativa cuando se descubrió que las respuestas de anticuerpos a distintas sustancias simples, antigé-

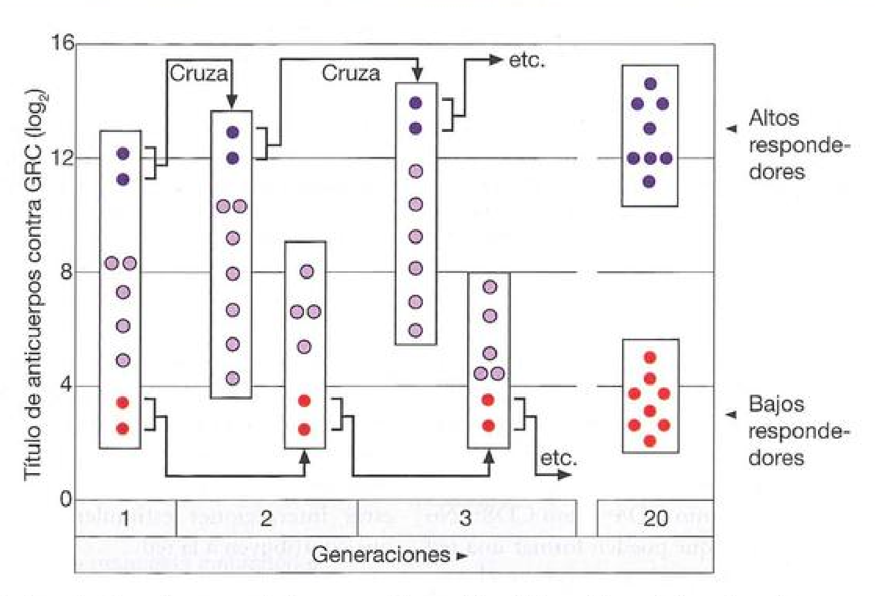


Figura 10.15. Cruzamiento selectivo de respondedores que desarrollan títulos altos y bajos de anticuerpos.

Se inmuniza a una población original de ratones genéticamente intactos (con una composición genética diversa y gran variabilidad en la respuesta de anticuerpos) con eritrocitos de carnero (GRC), un antígeno que contiene numerosos determinantes. El título de anticuerpos de cada ratón se muestra con un círculo. Se aparearon un macho y una hembra con el título máximo de anticuerpos (●) y sus descendientes se expusieron al antígeno. De nuevo, se aparearon los que respondieron mejor y así sucesivamente durante 20 generaciones, cuando todos los ratones eran muy respondedores para los GRC y una variedad de antígenos distintos. Lo mismo se hizo con los de respuesta más baja (●), lo cual dio una cepa de animales de baja respuesta. Las dos líneas son comparables en su capacidad para eliminar partículas de carbono o GRC de la sangre por fagocitosis, pero los macrófagos de los muy respondedores presentan el antígeno de manera más eficiente. Por otra parte, los animales poco respondedores sobreviven mejor a la infección por *Salmonella typhimurium* y sus macrófagos sostienen una replicación mucho más lenta de *Listeria*, lo cual indica una capacidad microbicida intrínseca más agresiva.

Cuadro 10.1. Haplotipo H-2 ligado a respuestas inmunitarias altas, bajas e intermedias contra péptidos sintéticos. (T,G)-A-L, polilisina con cadenas laterales de polialanina con extremos al azar con tirosina y glutamina; (H,G)-A-L, lo mismo con histidina en lugar de tirosina.

ANTÍGENO	HAPLOTIPO H-2				
	b	k	d	a	s
(T,G)-A-L	Alta	Baja	Int	Baja	Baja
(H,G)-A-L	Baja	Alta	Int	Alta	Baja

nicamente timodependientes, están determinadas por genes que se mapean en el CMH. Por ejemplo, los ratones del haplotipo *H-2*^{b} responden bien contra el polipéptido ramificado sintético (T,G)-A-L, mientras que los ratones *H-2*^{k} responden de manera deficiente (Cuadro 10.1). Se expresó que los ratones del haplotipo H-2^b (es decir, un conjunto particular de genes *H-2*) son **muy respondedores** a (T,G)-A-L porque tienen el gen apropiado de la respuesta inmunitaria (*Ir*). Con otro antígeno sintético, (H,G)-A-L, que tiene histidina en lugar de tirosina, la posición se invierte, y los "malos respondedores para (T,G)-A-L" proporcionan ahora una buena respuesta de anticuerpos, y los "buenos respondedores para (T,G)-A-L" dan una débil, lo cual indica que la capacidad de una cepa determinada para dar una respuesta alta o baja varía con cada antígeno (Cuadro 10.1). Estas relaciones sólo son evidentes cuando se estudian antígenos de estructura sumamente restringida, porque la respuesta a cada determinante está controlada por un gen *Ir* y es menos probable que los diferentes determinantes en un antígeno complejo se asocien todos con genes *Ir* de respuesta constantemente alta o baja. Sin embargo, aunque se esperaría un promedio de genes de alta y baja respuesta aleatoria, dado que los distintos determinantes en la mayoría de los antígenos complejos timodependientes no están relacionados desde el punto de vista estructural, el resultado se verá afectado por la dominancia de uno o más epítopos.

Con los antígenos complejos, en la mayoría de los casos, pero no en todos, la relación con H-2 habitualmente sólo se observa cuando la dosis administrada es tan baja que el sistema inmunitario reconoce nada más que un determinante inmunodominante. De esta forma, las reacciones controladas por genes *Ir* son distintas de la capacidad de respuesta global contra diversos antígenos complejos, lo cual es una característica de los ratones Biozzi (véase antes).

Los genes Ir se hallan en la región H-21 del ratón y controlan la presentación antigénica a las células T αβ

El Cuadro 10.2 proporciona cierta idea acerca del tipo de análisis utilizado para mapear los genes *Ir*. Las tres cepas de muy respondedores tienen genes H-2 individuales derivados de cepas puras prototípicas (B.10 y A. SW) que se aparearon en forma cruzada para producir recombinaciones dentro de la región H-2. Los únicos genes que tienen en

Cuadro 10.2. Mapeo del gen *Ir* para las respuestas (H,G)-A-L mediante el análisis de diferentes cepas recombinantes

Cepa	Región H-2				Respuesta (H,G)-A-L
	K	A	E	D	
A	k	k	k	b	Alta
A,TL	s	k	k	b	Alta
B.I0.A (4R)	k	k	b	b	Alta
B.I0	b	b	b	b	Baja
A.SW	s	s	s	s	Baja

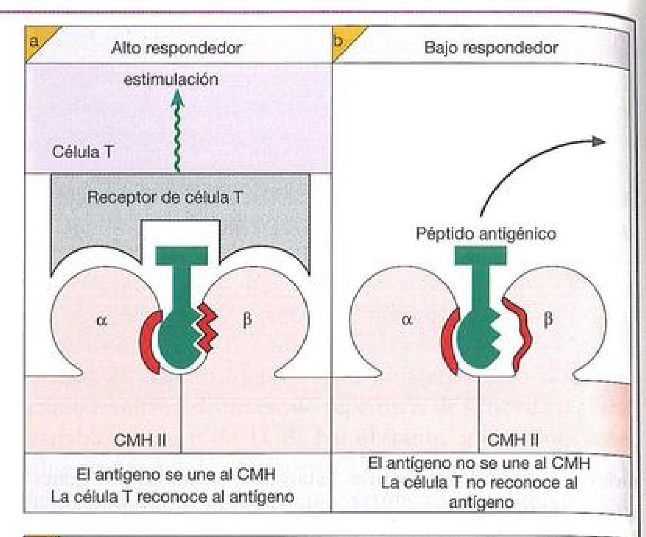
común son A^k y D^b; dado que la cepa B.10 que tiene el *gen* D^b corresponde a un individuo poco respondedor, una respuesta alta debe estar relacionada en este caso con presencia de A^k. Las moléculas de la región I (I-A y I-E) son moléculas de clase II del CMH, y los polimorfismos dentro de estos genes afectan la hendidura de unión al péptido y, por lo tanto, su capacidad para presentar el antígeno a las células T CD4$^+$. Así, ellas influyen directamente en la capacidad de respuesta de los ratones respecto de su respuesta de anticuerpos contra antígenos timodependientes *in vivo*. En realidad, hay una buena correlación entre la proliferación de células T específica para el antígeno y la capacidad de respuesta del animal. Esto también explica por qué estos efectos del gen *H-2* se observan con antígenos de las células B timodependientes pero no con antígenos timoindependientes.

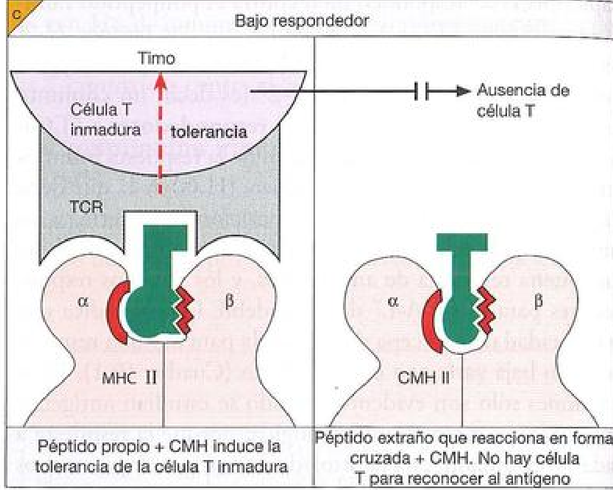
Se han propuesto tres mecanismos para explicar la alta capacidad y la baja capacidad de respuesta relacionadas con las moléculas de clase II.

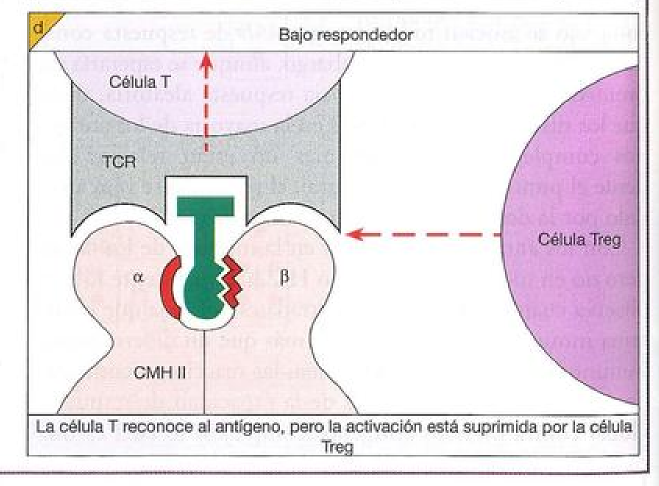
1 *Presentación defectuosa*. En un individuo muy respondedor, el procesamiento del antígeno y su reconocimiento por una célula T correspondiente conducen a la activación y a la expansión clonal de los linfocitos (Figura 10.16a). Aunque hay (y debe haber) una degeneración considerable en la especificidad de la hendidura de las moléculas de clase II para la unión al péptido, la variación de ciertos residuos clave puede alterar la fuerza de unión a un péptido particular y convertir un ratón muy respondedor en otro poco respondedor, porque el CMH no presenta el antígeno a la célula T reactiva (Figura 10.16b). A veces, el procesamiento natural de un antígeno en un individuo dado no produce un péptido que corresponda bien con las moléculas del CMH. Un estudio demostró que un clon de células T citotóxicas restringidas al HLA-A2, que reconoció los residuos 58-68 de la proteína de la matriz del virus de influenza A, podía reaccionar en forma cruzada con células de un individuo HLA-A69 estimuladas con el mismo péptido; no obstante, el clon no reconocía las células HLA-A69 *infectadas* por virus de influenza A. Es interesante destacar que los individuos con las moléculas de clase I del CMH del

Figura 10.16. Diferentes mecanismos pueden explicar la baja respuesta de las células T al antígeno en asociación con las moléculas de clase II del CMH.

a) Para la activación de las células T CD4$^+$, es necesario que el péptido se una con gran afinidad a la hendidura de unión formada por los dominios α_1 y β_1 de una molécula de clase II del CMH y, entonces, que el TCR se una al complejo péptido-CMH. (b) Si el péptido es incapaz de unirse a la hendidura del CMH, es claro que no hay posibilidad de una respuesta de célula T. c) Durante la selección negativa en el timo, las células T se vuelven tolerantes a los péptidos provenientes de los antígenos propios, y esta tolerancia se extenderá a todos los péptidos similares (que reaccionan en forma cruzada) provenientes de los antígenos extraños.
d) Aun cuando el péptido se una al CMH y la célula T posea un TCR adecuado, en determinadas circunstancias puede bloquearse la capacidad de respuesta por la presencia de las células Treg.







HLA-A69 desarrollan inmunidad contra un epítopo diferente en la misma proteína.

2 *Repertorio defectuoso de células T.* Las células T con una afinidad moderada a alta por las moléculas del CMH propio y sus complejos con autoantígenos procesados perderán la capacidad de respuesta, lo que crea una brecha ("agujero") en el repertorio de células T. Si se produce una reacción cruzada, o sea, similitud estructural en el nivel de reconocimiento de las células T entre un antígeno extraño y una molécula propia que ya ha inducido falta de respuesta, el huésped carecerá de células T específicas para el antígeno extraño y, por consiguiente, será poco respondedor (Figura 10.16c). Para dar un ejemplo concreto, los ratones de la cepa DBA/2 responden bien al péptido sintético poliglutamilo, politirosina (GT), mientras que los ratones BALB/c no lo hacen, aunque ambos tienen genes de clase II idénticos. Los blastos de células B de BALB/c expresan una estructura que imita a GT, y la presunción sería que la autotolerancia convierte a estos ratones en no respondedores a GT. Esto fue confirmado con la demostración de que los ratones de DBA/2 que se convirtieron en tolerantes por una cantidad pequeña de células hematopoyéticas de BALB/c pasaron de un estado de muy respondedores a otro de poco respondedores. Para concluir la historia de una forma muy satisfactoria, se observó que los ratones DBA/2 a los que se inyectaron blastos B de BALB/c, inducidos por lipopolisacárido activador policlonal, estaban programados para GT.

3 *Supresión por células T.* Nos gustaría referirnos otra vez a la supresión transferible que puede aparecer con antígenos relativamente complejos, ya que ilustra la idea de que el estado de poco respondedor puede surgir como resultado de la actividad de las células reguladoras (Figura 10.16d). La baja respuesta puede ser dominante en los heterocigotos de clase II, lo cual indica que la supresión puede actuar contra Th restringida a cualquier otra molécula de clase II. En esto difiere de los modelos 1 y 2 anteriores, en los cuales la alta respuesta es dominante en un heterocigoto porque los factores asociados con el gen del poco respondedor (presentación defectuosa o repertorio defectuoso de células T) no pueden influir en la actividad del muy respondedor si también está presente.

Los factores que intervienen en el control genético de la respuesta inmunitaria se resumen en la Figura 10.17.

Redes inmunoneuroendocrinas reguladoras

A medida que nos centramos cada vez más en las excentricidades del sistema inmunitario, existe el peligro de considerarlo como un conjunto de células mieloides y linfoides vagando en un gran saco, sin tener en cuenta su fisiología integrada. Dentro del contexto fisiológico más amplio, se ha llamado cada vez más la atención acerca de las interacciones entre los sistemas inmunitario y neuroendocrino.

Las células inmunitarias tienen los receptores que les permiten recibir señales de una amplia variedad de hormonas: corticosteroides, insulina, somatotropina (hormona de crecimiento), estradiol, testosterona, prolactina, agentes β-adrenérgicos, acetilcolina, endorfinas y encefalinas. En general, los gluco-

DC/Mac
Genes del CMH
Genes del TCR
Genes del CMH
Genes de Ig
T
B
Genes que determinan:
Expresión de PRR
Captación del Ag (CPA)
Procesamiento del Ag(CPA)
Presentación del Ag (CPA)
Activación celular
Producción de citocina
Proliferación de linfocitos
Muerte (Mac, LTC)

Figura 10.17. Control genético de la respuesta inmunitaria.

Varios genes determinan la capacidad de respuesta inmunitaria, que comprenden los genes que se recombinan para generar los receptores de linfocitos específicos para el antígeno, los genes muy polimorfos del CMH y los genes que determinan diversas actividades de las células de sistema inmunitario. CPA, células presentadoras de antígeno profesionales (células dendríticas [DC], macrófagos [Mac], células B); PRR, receptores del reconocimiento de patrones.

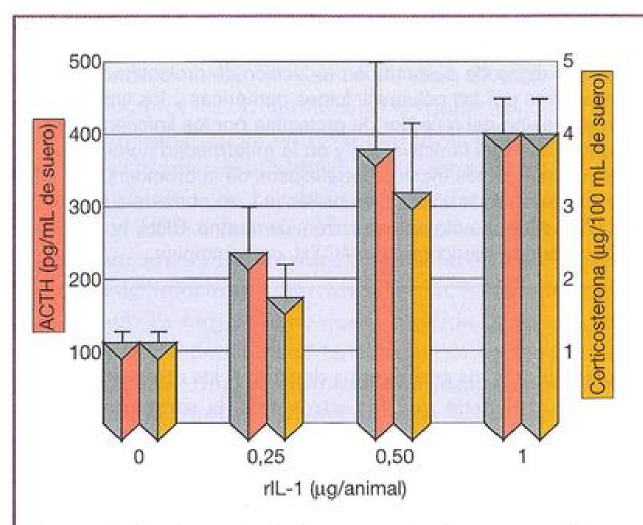


Figura 10.18. Aumento de las concentraciones sanguíneas de ACTH y corticosterona en ratones C3H/HeJ 2 horas después de la inyección de IL-1recombinante

Los valores son medias ± error estándar de la media (EEM) para grupos de siete u ocho ratones. La importancia de la cepa murina utilizada es que carece de los receptores para el lipopolisacárido bacteriano (LPS) y, en consecuencia, los efectos no pueden atribuirse a la contaminación por LPS de la preparación de IL-1. (Reimpreso de Besedovsky H., Del Rey A., Sorkin E. y Dinarello C.A. [1986], *Science* **233**, 652-654, con autorización. Copyright © 1986 por AAAS.)

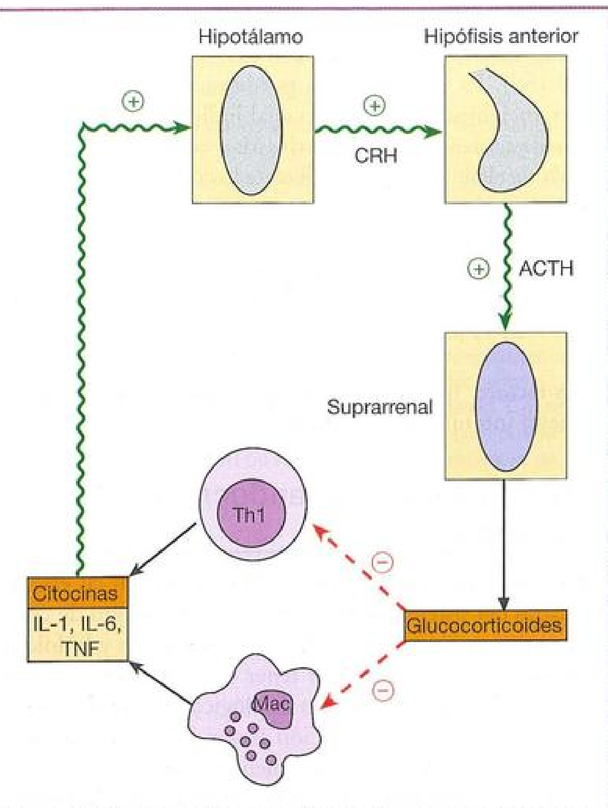


Figura 10.19. Retroalimentación negativa de los glucocorticoides en la producción de citocinas.

Casi con certeza, puede establecerse la existencia de circuitos reguladores adicionales basados en interacciones neuroendocrinas con el sistema inmunitario, ya que las células linfoides y mieloides en los órganos linfoides primarios y secundarios pueden producir hormonas y neuropéptidos, y las glándulas endocrinas clásicas, así como las neuronas y las células gliales, pueden sintetizar citocinas y receptores apropiados. Es digno de destacar la producción de prolactina y sus receptores por las células linfoides periféricas y los timocitos. La expresión del receptor de prolactina por los linfocitos está aumentada tras la activación y en la enfermedad autoinmunitaria atestigua los efectos beneficiosos de la bromocriptina, un inhibidor de la síntesis de prolactina, en el modelo NZB × NZW del lupus eritematoso sistémico murino. CRH, hormona liberadora de corticotropina; ACTH, corticotropina.

corticoides y los andrógenos deprimen las respuestas inmunitarias, mientras que los estrógenos, la somatotropina, la tiroxina y la insulina hacen lo opuesto.

Un circuito de retroalimentación neuroendocrina que afecta las respuestas inmunitarias

La secreción de **glucocorticoides** es una respuesta importante al estrés inducido por una gran diversidad de estímulos, como cambios extremos de temperatura, miedo, hambre y lesión física. También son liberados como consecuencia de respuestas inmunitarias y limitan esas respuestas en un circuito de retroalimentación neuroendocrina. Así, la IL-1 (Figura 10.18), la IL-6 y el TNF son capaces de estimular la síntesis de glucocorticoides y lo hacen a través del eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal. Esto, a su vez, conduce a la inhibición de la actividad de Th1 y macrófagos, de modo que se completa el circuito de retroalimentación negativa (Figura 10.19). Aunque los glucocorticoides también inhiben las células Th2, los mecanismos por los que inhiben las células Th1 y Th2 son diferentes, y su inhibición de las Th1 es mucho más potente. Ellos reprimen intensamente el factor de transcripción T-bet que es necesario para la diferenciación en el fenotipo Th1, pero inhiben con menor vehemencia el factor de transcripción GATA3 requerido para la diferenciación en células Th2. Los efectos inmunosupresores de los glucocorticoides son reforzados mediante la inducción de células T reguladoras. Así, la incubación de células dendríticas con el glucocorticoide dexametasona da por resultado la expresión de GILZ (*glucocorticoid-induced leucine zipper*; cremallera de leucina inducida por glucocorticoides), que favorece la expresión de Foxp3 por las células dendríticas en la Treg inducibles.

Se demostró que la suprarrenalectomía evita la recuperación espontánea de la encefalomielitis alérgica experimental. Esta enfermedad desmielinizante se asocia con parálisis progresiva y es causada por la inmunización con la proteína básica mielina en el adyuvante completo de Freund. La inducción de la enfermedad puede ser bloqueada por implantes de corticosterona. La recuperación espontánea de esta encefalomielitis en animales indemnes se asocia con una dominancia de clones de Th2 específicos para autoantígenos, lo que respalda el punto de vista de que los glucocorticoides suprimen de modo más poderoso las respuestas Th1 y pueden aumentar las Th2. En consecuencia, es previsible que los individuos con una predisposición genética a concentraciones elevadas de glucocorticoides inducidos por estrés presenten una susceptibilidad mayor a las infecciones por patógenos intracelulares como *Mycobacterium leprae*, que requieren una inmunidad mediada por células Th1 efectiva para su erradicación.

La exposición neonatal a la endotoxina bacteriana (LPS) no sólo ejerce una influencia a largo plazo en el desarrollo de los sistemas endocrino y nervioso central, sino que afecta de manera sustancial la predisposición a la enfermedad inflamatoria y, por consiguiente, parece programar o "restablecer" el desarrollo funcional tanto del sistema endocrino como del inmunitario. Así, en la vida adulta, las ratas que habían estado expuestas a endotoxinas durante la primera semana de vida presentaban concentraciones basales más elevadas de corticosterona cuando se compararon con los animales de control, y mostraron un aumento mayor en las concentraciones de corticosterona en respuesta al estrés por el ruido y una elevación más rápida en las concentraciones de corticosterona tras el desafío con LPS.

El efecto del género

A menudo las mujeres presentan respuestas inmunitarias más intensas y son mucho más susceptibles a las enfermedades autoinmunitarias; éstas se analizarán con mayor profundidad en el Capítulo 18. Es de destacar que los receptores para estrógenos y andrógenos están presentes en diversos tipos de células del sistema inmunitario, como linfocitos y macrófagos. Aunque las investigaciones referidas a la función de los estrógenos en las respuestas inmunitarias a

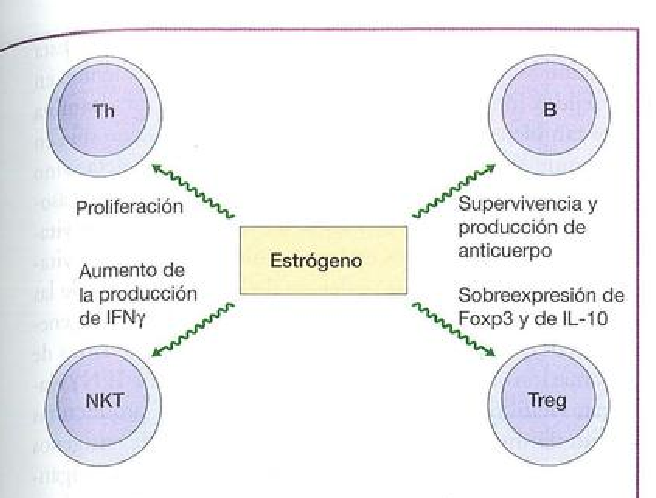


Figura 10.20. Algunos efectos de los estrógenos sobre la función de los linfocitos.

menudo condujeron a datos aparentemente contradictorios, con frecuencia se observó que aumentan las respuestas de linfocitos. Del mismo modo, la disminución de andrógenos inducida por la castración de ratones machos pospuberales aumenta los niveles de células T en los tejidos linfoides secundarios y aumenta la proliferación de células T.

Si bien los estrógenos pueden tener un efecto beneficioso sobre las respuestas de células T *helper*, células B y células NKT (Figura 10.20), debe señalarse que también pueden causar la expansión de clones de células T $CD4^{+}CD25^{+}$ y que aumentan la expresión de Foxp3 e IL-10 en estas células supresoras. Con respecto a las células NKT, las concentraciones sustancialmente elevadas de IFNγ producidas por estas células cuando son estimuladas con el antígeno en presencia de concentraciones fisiológicas de estrógeno proveen una explicación posible a la observación de que los ratones hembras producen niveles más elevados de esta citocina en respuesta a la exposición al antígeno.

La hormona hipofisaria prolactina también tiene actividad inmunoestimuladora para varias células del sistema inmunitario, como células T, células B, células, macrófagos y células dendríticas. Se observó que aumenta la respuesta de anticuerpos porque disminuye la deleción clonal de células B y porque disminuye el umbral para alterar la anergia en las células B, y se describieron concentraciones elevadas de esta hormona en varias enfermedades autoinmunitarias sistémicas.

"Psicoinmunología"

Los tejidos linfoides tanto primarios como secundarios están profusamente inervados por el sistema nervioso simpático. La enzima dopamina β-hidroxilasa cataliza la conversión de dopamina en el neurotransmisor catecolamínico noradrenalina, que es liberada por las neuronas simpáticas en estos tejidos. Los ratones en los que se produjo la deleción del gen que codifica esta enzima mediante recombinación homóloga mostraron aumento de la susceptibilidad a la infección por *Mycobacterium tuberculosis* y se comprobó una deficiencia mayor de la producción de las citocinas de Th1 IFNγ y TNF en respuesta a la infección por este patógeno intracelular. Aunque estos animales no mostraron defectos evidentes del desarrollo en su sistema inmunitario, también se observó la deficiencia de las respuestas Th1 después de su inmunización con el hapteno TNP acoplado con hemocianina. Estas observaciones sugieren que la noradrenalina puede actuar en la determinación de la potencia de la respuesta inmunitaria.

La piel desnervada presenta infiltración muy reducida de leucocitos en respuesta al daño local, lo cual vincula las neuronas cutáneas con el reclutamiento de leucocitos. Los nervios simpáticos que inervan los vasos y los ganglios linfáticos intervienen en la regulación del flujo de linfa y pueden participar en el control de la migración de las células dendríticas con receptores β-adrenérgicos desde los sitios inflamatorios hasta los ganglios linfáticos locales. A menudo, los mastocitos y los nervios guardan una relación anatómica íntima, y el factor de crecimiento nervioso produce la desgranulación de los mastocitos. El tracto gastrointestinal también cuenta con una inervación extensa y una cantidad elevada de células efectoras inmunitarias. En este contexto, la capacidad de la sustancia P para estimular la proliferación de los linfocitos de las placas de Peyer y de la somatostatina para inhibirla pueden adquirir más que una importancia trivial.

Al parecer, hay una interacción entre inflamación y crecimiento nervioso en las regiones de curación y reparación de heridas. Los mastocitos suelen ser abundantes, la IL-6 induce el crecimiento de las neuritas y la IL-1 incrementa la producción del factor de crecimiento nervioso en explantes del nervio ciático. La IL-1 también aumenta el sueño de ondas lentas cuando se introduce en el ventrículo lateral del cerebro, y tanto la IL-1 como el interferón ejercen efectos pirógenos a través de su acción sobre el centro que controla la temperatura.

Aunque no está claro de qué modo estos diversos efectos neuroendocrinos se corresponden en la regulación de las respuestas inmunitarias, en un nivel más fisiológico el estrés y los ritmos circadianos modifican el funcionamiento del sistema inmunitario. Se ha observado que factores como el encierro, el ruido y la ansiedad por un examen influyen en algunas funciones inmunitarias, como la fagocitosis, la proliferación de linfocitos, la actividad de células NK y la secreción de IgA. Es sorprendente que la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado de Mantoux pueda ser modificada por la hipnosis. Una demostración sofisticada del control del sistema nervioso es la que proveen los estudios que muestran la supresión de las respuestas inmunitarias convencionales y el refuerzo de la actividad de las células NK por el condicionamiento de Pavlov. En el paradigma clásico de Pavlov, un estímulo como el alimento, que incondicionalmente produce una respuesta particular, en este caso salivación, se asocia repetidas veces con un estímulo neutro que no induce la misma respuesta. Por último, el estímulo neutro se convierte en un estimulo condicional y causa salivación en ausencia de alimentos. Se administró a ratas de manera reiterada ciclofosfamida (un fármaco inmunosupresor) como estímulo incondicional y sacarina como estímulo condicional; con posterioridad hubo una respuesta menor de anticuerpos cuando los animales fueron expuestos a un

antígeno solo con el agregado del estímulo condicional, la sacarina. A medida que se acumulan datos resulta más claro el modo en que las redes neuroendocrinas pueden participar en la alergia y las enfermedades autoinmunitarias, como la artritis reumatoide, la diabetes mellitus tipo I y la esclerosis múltiple.

Efectos de la dieta, los contaminantes y el traumatismo sobre la inmunidad

La desnutrición disminuye la eficacia de la respuesta inmunitaria

La susceptibilidad muy aumentada a la infección de los individuos desnutridos puede atribuirse a muchos factores: condiciones sanitarias y de higiene personal deficientes, hacinamiento y educación sanitaria inadecuada. No obstante, existen efectos importantes de la **desnutrición calorico-proteica** sobre la inmunocompetencia. La atrofia difusa de los tejidos linfoides y la reducción sustancial de células T CD4 circulantes son factores subyacentes de un deterioro grave de la inmunidad mediada por células. Las respuestas de anticuerpos pueden estar conservadas, pero son de menor afinidad; la fagocitosis de las bacterias es relativamente normal, si bien la destrucción intracelular ulterior resulta defectuosa. Las deficiencias de piridoxina, ácido fólico y vitaminas A, C y E suelen provocar un deterioro de las respuestas inmunitarias.

La deficiencia de cinc es bastante interesante, ya que reduce la actividad del timo y de las hormonas tímicas, cambia el equilibrio Th1/Th2 hacia respuestas dominadas por Th2 que disminuye la eficacia de la vacunación y conduce a una disminución de la actividad de las células fagocíticas y NK. Entre tanto, la deficiencia de hierro deteriora el estallido oxidativo en los neutrófilos ya que la flavocitocromo NADP oxidasa es una enzima dependiente del hierro.

Por supuesto, hay una contrapartida de todo esto, ya que la restricción moderada del ingreso calórico total o la reducción pronunciada en el ingreso de grasas mejoran las enfermedades vinculadas con la edad y las afecciones autoinmunitarias, al menos en modelos animales. Se observó que los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (PUFA), que se encuentran en aceites de pescados, resultaron protectores en algunos, pero no en todos, de los ensayos clínicos que incluyen pacientes con artritis reumatoidea. Tal vez, este hecho no es demasiado sorprendente ya que ahora está confirmada la observación de que los PUFA disminuyen la producción de varias citocinas proinflamatorias, que comprenden al TNF.

Las vitaminas A y D muestran efectos inmunomoduladores

El ácido retinoico, un metabolito de la **vitamina A**, estimula el desarrollo de células T reguladoras y células Th2, pero inhibe la producción de células Th 17. Entre las células que producen ácido retinoico están las células dendríticas del intestino, que conduce al sellado de las células T con el receptor para la quimiocina CCR9 y la integrina $\alpha_4\beta_7$, el ligando para la adresina de la mucosa MadCAM-1. Esta situación asegura que los linfocitos adecuados se asienten en los tejidos linfoides asociados con el intestino. La **vitamina D** es también un regulador importante. Se forma no sólo en la dermis bajo el efecto de la radiación ultravioleta, sino también en los macrófagos activados, y la hipercalcemia asociada con sarcoidosis es atribuible a la producción de la vitamina por los macrófagos en los granulomas activos. La vitamina D es un inhibidor poderoso de la proliferación de las células T y de la producción de las citocinas Th1. Esto genera un circuito de retroalimentación definido en los sitios de inflamación donde los macrófagos activados por IFNγ elaboran vitamina D, que suprime a las células T productoras de interferón. También inhibe la presentación de antígenos por los macrófagos y estimula la formación de células gigantes multinucleadas en las lesiones granulomatosas crónicas. Al igual que la vitamina A, promueve la actividad Th2, sobre todo en las superficies mucosas, estimula la actividad Treg e inhibe la diferenciación de las células Th17: una vitamina bastante ocupada.

Otros factores

Dada la demora en la toma de conciencia general respecto de la importancia de la contaminación ambiental, es necesario controlar la naturaleza y los niveles de **polución** que pueden influir en la inmunidad. Éste es sólo un ejemplo: los compuestos orgánicos polihalogenados (como bifenilos policlorados) invaden de manera constante el medioambiente, y como son estables y lipófilos, se acumulan con facilidad en la cadena de alimentos acuáticos donde resisten en gran medida la degradación metabólica. Se demostró que los arenques del mar Báltico con niveles relativamente altos de estos contaminantes, comparados con los del Atlántico no contaminados, eran inmunotóxicos cuando se alimentaba con ellos a focas cautivas, lo cual sugiere por qué a lo largo de las costas del noroeste de Europa las focas sucumbieron, en 1988, de una manera alarmante a la infección por el virus del moquillo que, en otras circunstancias, no es virulento en las focas.

Los **traumatismos múltiples**, las operaciones quirúrgicas y las quemaduras graves también tienen efectos inmunodepresores y por esto contribuyen al aumento del riesgo de sepsis. Los corticosteroides producidos por situaciones de estrés, la prostaglandina E_2 inmunosupresora liberada de los tejidos dañados y la endotoxina bacteriana proveniente de la alteración de la flora intestinal son todos factores que influyen en la evolución después de un traumatismo.

Efectos del envejecimiento

Las personas mayores son más propensas a las infecciones, y sus respuestas a las vacunas son menores cuando se las compara con las de gente más joven. Alentado por la mayor longevidad, es creciente el interés centrado en la compresión de cómo se desgasta nuestro sistema inmunitario con la edad. Ahora es evidente que declinan los fenómenos tanto adaptativos como innatos de la respuesta inmunitaria (Figura 10.21).

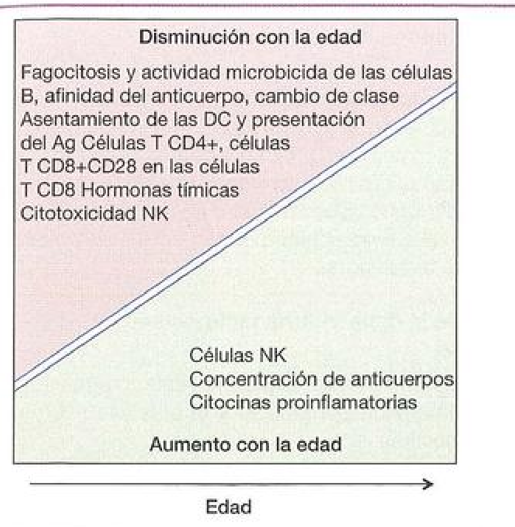


Figura 10.21. Tendencias con la edad de algunos parámetros inmunitarios.

La involución tímica que se produce en la pubertad conduce a una menor producción de células T y de hormona tímica. A medida que progresa la edad, hay una disminución en los valores absolutos de las células B y T, pero un aumento en el número absoluto de células NK. Aunque las poblaciones de células T $CD4^+$ y $CD8^+$ disminuyen, quizá los cambios más profundos aparecen en el compartimiento CD8. Después de la división repetida de las células $CD8^+$ pierden la expresión de la molécula CD28 necesaria para la coestimulación. El hecho de llevar a cabo durante toda la vida respuestas inmunitarias, junto con el menor rendimiento tímico, conduce por último al agotamiento clonal de células T. Este agotamiento es una consecuencia del hecho de que las respuestas de linfocitos dependen de la proliferación clonal. Hay un número finito de veces que una célula puede dividirse, el límite de Hayflick, y esto está asociado con el acortamiento de la longitud de los telómeros en los extremos de los cromosomas. Una vez que se alcanza este límite las células llegan a la senectud y ya no pueden dividirse. Los linfocitos senescentes, que se sabe que tienen un fenotipo de memoria, ocupan nichos que de otro modo podrían ser ocupados por células T proliferante en respuesta a la infección.

En lo que respecta a las células B, hay una disminución en el número celular así como en la capacidad de cambiar de clase en las células tanto de sangre periférica como esplénicas. Hay concentraciones reducidas de la enzima citidina desaminasa inducida por la activación en los linfocitos B aislados de los ancianos; esta enzima es necesaria tanto para el cambio de clase como para la maduración de la afinidad. De modo bastante paradójico, no sólo las concentraciones de anticuerpos IgM, sino también las de IgG e IgA, están aumentadas en las personas de edad. Sin embargo, al menos algunos de estos anticuerpos son de afinidad relativamente baja. El aumento de las concentraciones totales de anticuerpos IgG e IgA puede reflejar la secreción por los plasmoblastos de la médula ósea de anticuerpos con hipermutación somática limitada.

En cuanto a las respuestas innatas, disminuye la actividad fagocítica de neutrófilos y macrófagos, como lo hace su actividad microbicida. Al parecer, las células dendríticas tienen disminución de la capacidad de asentarse en los ganglios linfáticos y la de estimular las células T. No todo declina con la edad. Las citocinas proinflamatorias, como IL-1, IL-6 y TNF, aumentan y, como se mencionó, también lo hacen los números de células NK. Sin embargo, la respuesta proliferativa de estas células NK a la IL-2 y su capacidad de destrucción también están afectadas.

RESUMEN

Control por el antígeno

- Las respuestas inmunitarias son inducidas en gran parte por el antígeno. A medida que disminuye el nivel de antígenos, también lo hace la intensidad de la respuesta.
- Los antígenos pueden competir entre sí como resultado de la pugna entre los péptidos procesados por las hendiduras disponibles del CMH.

Control por retroalimentación por el complemento y los anticuerpos

- Los antígenos recubiertos con C3d pueden aumentar las respuestas de anticuerpos por entrecruzamientos del receptor para el complemento CD21 con el BCR.
- Los anticuerpos IgM, IgG e IgE pueden inducir sus respuestas mediante la activación del complemento por la vía clásica (IgM, IgG) o por la facilitación de la captación del antígeno mediada por FcR por las CPA.
- La IgG también puede limitar las respuestas de anticuerpos por un mecanismo de retroalimentación negativa a través del FcγRIIb inhibidor en las células B y también por efectos independientes del Fc que tal vez implica el enmascaramiento del epítopo de modo que el antígeno ya no es más reconocido por el BCR de la célula B.

Regulación de las células T

- Las células T activadas expresan miembros de la familia de receptores para TNF, entre ellos Fas, que actúan como receptores de muerte y restringen la expansión clonal ilimitada mediante un proceso denominado muerte celular inducida por activación.
- Las células T reguladoras (Treg) pueden suprimir la actividad de las células T *helper* y de las células T **citotóxicas** así como de la actividad de las células dendríticas y de las células B.
- Los epítopos supresor y *helper* pueden existir en la misma molécula.
- Los efectores de la supresión incluyen los que aparecen en las Treg naturales $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, que se originan directamente en el timo, y las Treg inducibles, que expresan sólo Foxp3 después de su activación en la periferia. Ambas parecen actuar por medio de mecanismos dependientes del contacto celular.
- Otros tipos de células T reguladoras actúan mediante la secreción de citocinas inmunosupresoras; las células Tr1 producen IL-10 y las células Th3 liberan TGFβ. Las células T γδ inmunorreguladoras, las células T supresoras $CD8^+$ y las células supresoras mieloides también pueden contribuir a la inhibición de las respuestas inmunitarias.

- Las células Th1 y Th2 se inhiben mutuamente entre sí a través de la producción de sus respectivas citocinas IFNγ e IL-4/IL-10.
- Las células Treg y Th17 también muestran una relación recíproca. El factor de transcripción Foxp3 asociado con la actividad de las células T reguladoras bloquea el factor de transcripción RORγt requerido para la actividad de la célula Th17.

Redes idiotípicas

- Los receptores específicos de antígeno de los linfocitos pueden interactuar con los idiotipos sobre los receptores de otros linfocitos para formar una red (Jerne) que pueden regular en forma natural las respuestas inmunitarias.
- También pueden demostrarse interacciones idiotípicas de células T.
- La red ofrece la posibilidad de intervenciones terapéuticas para manipular la inmunidad.
- Los antiidiotipos de "imagen Interna" pueden usarse para imitar los antígenos.

Los factores genéticos influyen en la respuesta inmunitaria

- Varios genes controlan la respuesta global de anticuerpos para formar complejos con los antígenos: algunos afectan el procesamiento del antígeno y la actividad microbicida del macrófago y otro la velocidad de proliferación de las células B en proceso de diferenciación.
- Los genes de inmunoglobulinas y TCR son muy adaptables porque se reordenan para crear receptores de antígenos, pero pueden producirse brechas ("agujeros") en el repertorio.
- Los genes de la respuesta inmunitaria se localizan en el locus de las moléculas clase II del CMH y controlan las interacciones entre las células presentadoras de antígeno profesionales y las células T.
- La capacidad de respuesta alta y baja ligada a las moléculas de clase II puede deberse a la presentación defectuosa por el CMH un repertorio de célula T defectuoso causado por la tolerancia al CMH + péptidos propios y a la supresión por células T.

Redes inmunoneuroendocrinas

- Los sistemas inmunitario, neurológico y endocrino interactúan y forman circuitos reguladores.
- La retroalimentación por citocinas aumenta la producción de corticosteroides y es importante porque esto inhibe la actividad de Th1 y macrófago.
- Los estrógenos pueden aumentar las respuestas de células T y B, pero también pueden estimular la actividad de células reguladoras.

Efectos de la dieta y otros factores sobre la inmunidad

- La desnutrición caloricoproteica deteriora mucho la inmunidad mediada por células y la potencia microbicida de los fagocitos.
- Los traumatismos y la polución ambiental pueden actuar al deteriorar los mecanismos inmunitarios.
- Los ácidos grasos poliinsaturados inhiben la producción de citocinas proinflamatorias. Las vitaminas A y D estimulan las células Th2 y Treg y por consiguiente también inhiben las células Th1 y Th17, respectivamente.

Envejecimiento y respuesta inmunitaria

- Los ancianos son más propensos a las infecciones y responden de manera menos eficaz a las vacunas.
- La capacidad de las células fagocíticas para endocitar y matar a los microorganismos disminuye con la edad, así como la eficacia de las células dendríticas para asentarse en los ganglios linfáticos y su activación de las células T.
- La involución del timo en la pubertad da por resultado la producción reducida de células T.
- Los números de células T CD4+, células T CD8+ y células B disminuyen con la edad, aunque los números de células NK aumentan.
- La concentración de anticuerpos circulantes a menudo están elevadas en las etapas avanzadas de la vida, pero estos anticuerpos tienden a ser de baja afinidad.
- Las concentraciones de citocinas proinflamatorias TNF, IL-1 e IL-6 también aumentan con la edad.

LECTURAS ADICIONALES

Behn U. (2007) Idiotypic networks: toward a renaissance? Immunological Reviews 216, 142–152.

Cohen I.R. (2000) Tending Adam's Garden. Academic Press, London.

Feuerer M. et al. (2009) Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. Nature Immunology 10, 689–695.

Gabrilovich D.I. & Nagaraj S. (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. Nature Reviews Immunology 9, 162–174.

Hjelm F. et al. (2006) Antibody-mediated regulation of the immune response. Scandinavian Journal of Immunology 64, 177–184.

Korn T. et al. (2009) IL-17 and Th17 cells. Annual Review of Immunology 27, 485–517.

Nikolich-Zugich J. & Rudd B.D. (2010) Immune memory and aging: an infinite or finite resource? Current Opinion in Immunology 22, 535–540.

Shevach E.M. (2009) Mechanisms of Foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. Immunity 30, 636–645.

Taub D.D. (2008) Neuroendocrine interactions in the immune system. Cellular Immunology 252, 1–6.



CAPÍTULO 11

Ontogenia y filogenia

Conceptos clave

A modo de resumen...

El sistema inmunitario se basa en las células de las respuestas innatas y adaptativas. Las respuestas innatas, que no son específicas del antígeno y carecen de memoria inmunitaria, comprenden los neutrófilos, los eosinófilos, los mastocitos, los basófilos, los monocitos, los macrófagos, las células NK y diversos tipos de células dendríticas interdigitadas. Por el contrario, la respuesta adaptativa muy específica del antígeno que, de manera característica, desarrolla memoria inmunitaria se basa en los linfocitos. Estas células, que recombinan genes del receptor para el antígeno a fin de generar una diversidad increíble de reconocimiento del antígeno, comprenden a las células T *helper*, reguladoras y citotóxicas y las células B productoras de anticuerpos.

Roitt's Essential Immunology, Twelfth Edition. Peter J. Delves, Seamus J. Martin. Dennis R. Burton, Ivan M. Roitt.

Introducción

En este capítulo analizaremos el desarrollo (ontogenia) de las células del sistema inmunitario en los individuos y la evolución (filogenia) de la respuesta inmunitaria desde las especies primitivas hasta los mamíferos.

Prácticamente todas las células de la respuesta inmunitaria, con excepción de la célula dendrítica folicular, derivan de las células madre hematopoyéticas pluripotentes. Estas células madre se diferencian por diversas vías del desarrollo; las que están destinadas a convertirse en linfocitos son las primeras que migran al timo.

Antígenos CD

El análisis de las células del sistema inmunitario a menudo implica la detección de moléculas de la superficie celular que les permite a los científicos diferenciar un tipo de célula de otro. De hecho, la expresión de estas moléculas con mucha frecuencia se asocia con la diferenciación de células individuales a lo largo de las vías de desarrollo. En general, la detección de los así denominados "marcadores de la superficie celular" se basa en la utilización de anticuerpos como sondas para su expresión. Desde los sitios más alejados del mundo, los inmunólogos que han producido anticuerpos monoclonales dirigidos contra las moléculas de superficies de las células B y T, los macrófagos, los neutrófilos, las células *natural killer* (NK), y así sucesivamente, se reúnen cada cierto tiempo en grupos de trabajo internacionales para comparar la especificidad de sus reactivos, con un espíritu de cooperación que debería ser una lección para la mayoría de los políticos. Cuando se descubre que un grupo de anticuerpos monoclonales reacciona con el mismo polipéptido, representan claramente una serie de reactivos que definen un marcador determinado y se le asigna un número de CD (*cluster of differentiation;* **grupo de diferenciación**) que define el antígeno particular de la superficie celular reconocido por esos anticuerpos. Hasta ahora hay 363 antígenos CD asignados, algunos de ellos con subdivisiones en diferentes variantes, pero los enumerados en el Cuadro 11.1 son los más importantes para nuestro análisis. Es importante apreciar que el nivel de expresión de las moléculas de la superficie celular a menudo cambia cuando las células se diferencian o se activan, y que existen "subpoblaciones" celulares que expresan de manera preferente moléculas particulares. Cuando la "presencia" o "ausencia" de un antígeno CD dado se expresa en un nivel bajo, puede dar lugar a apreciaciones bastante subjetivas, por lo cual hay que advertir que este nivel de expresión no implica necesariamente falta de significación biológica.

Células madre hematopoyéticas

La hematopoyesis se origina en el saco vitelino primitivo, pero, a medida que avanza la embriogénesis, esta función la realiza el hígado fetal y por último, la médula ósea, donde continúa durante toda la vida. Se demostró que la **célula madre hematopoyética pluripotente** da origen a los eritrocitos (glóbulos rojos), los leucocitos (glóbulos blancos) y los megacariocitos, de los que surgen las plaquetas. Estos distintos tipos celulares se denominan en conjunto como "elementos corpusculares de la sangre" (Figura 11.1). Las células madre hematopoyéticas tienen una capacidad relativamente ilimitada de autorrenovarse a través de la creación de más células madre. Por ello, un animal puede ser completamente protegido contra los efectos letales de las altas dosis de irradiación mediante la inoculación de células de la médula ósea, que repoblarán sus sistemas linfoide y mieloide. La capacidad de autorrenovación no es absoluta y declina con la edad, en forma simultánea con el acortamiento de los telómeros.

La médula ósea contiene al menos dos tipos de células madre: la célula madre hematopoyética mencionada antes y una población minoritaria de células madre de la estroma de la médula ósea (también denominada célula madre mesenquimática de la médula ósea), que da origen a la estroma de la médula ósea y que, mediante señales apropiadas, puede diferenciarse en adipocitos (células grasas), osteocitos (células óseas), condrocitos (células del cartílago), miocitos (células musculares) y hepatocitos (células hepáticas). La célula madre hematopoyética en el ratón es $CD34^{bajo/-}$, Sca-1+, Thy-$1^{+/bajo}$, $CD38^{+}$, c-kit $(CD117)^{+}$ y lin^{-}, mientras que el fenotipo de superficie de la célula equivalente en el ser humano es $CD34^{+}$, $CD59^{+}$, Thy-1^{+}, $CD133^{+}$, $CD38^{bajo/-}$, c-$kit^{-/bajo}$ y lin^{-}. Resulta impresionante que menos de 10 de estas células previenen la muerte en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (IDCG) que reciben una irradiación letal.

Las células madre hematopoyéticas se diferencian dentro del microambiente de las células estromáticas que producen varios factores de crecimiento como IL-2 IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-11, IL-15, G-SCF, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor de la célula madre (*stem cell factor,* SCF), ligando flt-3, eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (TPO) y así sucesivamente. El SCF permanece asociado con la matriz extracelular y actúa sobre las células madre primitivas a través de su receptor, el tirosincinasa de la membrana c-kit, para promover la supervivencia de las células madre hematopoyéticas al evitar su apoptosis. Es necesario que la hematopoyesis se mantenga en estricto control, por ejemplo por el factor transformador del crecimiento β (TGFβ), que ejerce un efecto citostático sobre las células madre hematopoyéticas.

Los ratones con inmunodeficiencia combinada grave (IDCG) proporcionan un medio apto para los fragmentos de hígado y timo fetal humano que, implantados de manera contigua, producirán los elementos figurados de la sangre durante 6-12 meses.

El timo proporciona el ambiente para la diferenciación de células T

El timo está organizado en una serie de lóbulos sobre la base de redes de células epiteliales derivadas embriológica-

Cuadro 11.1. Algunos de los principales marcadores de grupos de diferenciación (CD, *cluster of differentiation*) de las células humanas. Un listado completo puede encontrarse en la sección Browse de la base de datos de *Human Cell Differentiation Molecules: http://www.hcdm.org/ Moleculeinformation/tabid/54/ Default.aspx.* *, activado; B, linfocitos B; FDC, células dendríticas foliculares; G, granulocitos; IDC, células dendríticas interdigitadas; LBP, proteína de unión al LPS; LPS, lipopolisacárido; Mast, mastocitos; Mac, macrófagos; Mϕ, monocitos; NK, células *natural killer*; T, linfocitos T.

CD	Expresión	Funciones
CD1	IDC, subpoblación B	Presenta glucolípidos y otros antígenos no peptídicos a las células T
CD2	T, NK	Receptor para el coestimulador de CD58 (LFA-3)
CD3	T	Elementos de transducción del receptor de células T
CD4	T restringida por moléculas de clase II del CMH, IDC, Mϕ, Mac	Receptor para las moléculas de clase II del CMH
CD5	T, subpoblación B	Interviene en la señalización del receptor para el antígeno
CD8	T restringida por moléculas de clase I del CMH	Receptor para las moléculas de clase I del CMH
CD14	G, Mϕ, Mac	Receptor para el complejo LPS/LBP
CD16	G, NK, B, Mac, IDC	FcγRIII (receptor de Ig de afinidad intermedia)
CD19	B, FDC	Parte del complejo del receptor para el antígeno de las células B
CD20	B	Proporciona señales para la activación y la proliferación de células B
CD21	B, FDC	CR2. Receptor para C3d y virus de Epstein-Barr. Parte del complejo de receptor para el antígeno de las células B
CD23	B, Mo, FDC	FcγRII (receptor de IgE de baja afinidad)
CD25	*T, *B, *Mϕ, *Mac	Cadena α del receptor de IL-2
CD28	T, *B	Receptor para coestimuladores CD80/CD86 (B7.1 y B7.2)
CD32	Mϕ, Mac, IDC, FDC, G, NK, B	FcγRII (receptor de Ig de baja afinidad)
CD34	Progenitores	Molécula de adhesión. Marcador de célula madre
CD40	B, Mac, IDC, FDC	Receptor para el coestimulador CD154 (CD40L)
CD45RA	Células T en reposo/vírgenes, B, G, Mϕ, NK	Fosfatasa, activación celular
CD45RO	Células T efectoras, Mϕ, Mac, IDC	Fosfatasa, activación celular
CD64	Mϕ, Mac, DC	FcγRI (receptor de Ig de alta afinidad)
CD79a/CD79b	B	Elementos de transducción Igα/Igβ del receptor de células B
CD80	*B, *T, Mac, DC	Receptor B7.1 para el coestimulador CD28 y para la señal inhibidora CTLA4
CD86	B, IDC, Mϕ	Receptor B7.2 para el coestimulador CD28 y para la señal inhibidora CTLA4
CD95	Generalizada	Receptor Fas para FasI (CD178). Transmite señales apoptósicas

mente de evaginaciones del endodermo intestinal de la tercera bolsa faríngea y que forman zonas corticales y medulares bien definidas (Figura 11.2). Esta estructura de células epiteliales proporciona el microambiente para la diferenciación de las células T. En los ratones neonatales y adultos, los progenitores de células T c-kit⁺ CD44⁺ llegan desde la médula ósea en olas de inmigración que parecen estar reguladas por la accesibilidad de nichos presuntos en el timo. Hay interacciones sutiles entre las proteínas de la matriz extracelular y una variedad de moléculas de adhesión y asen-

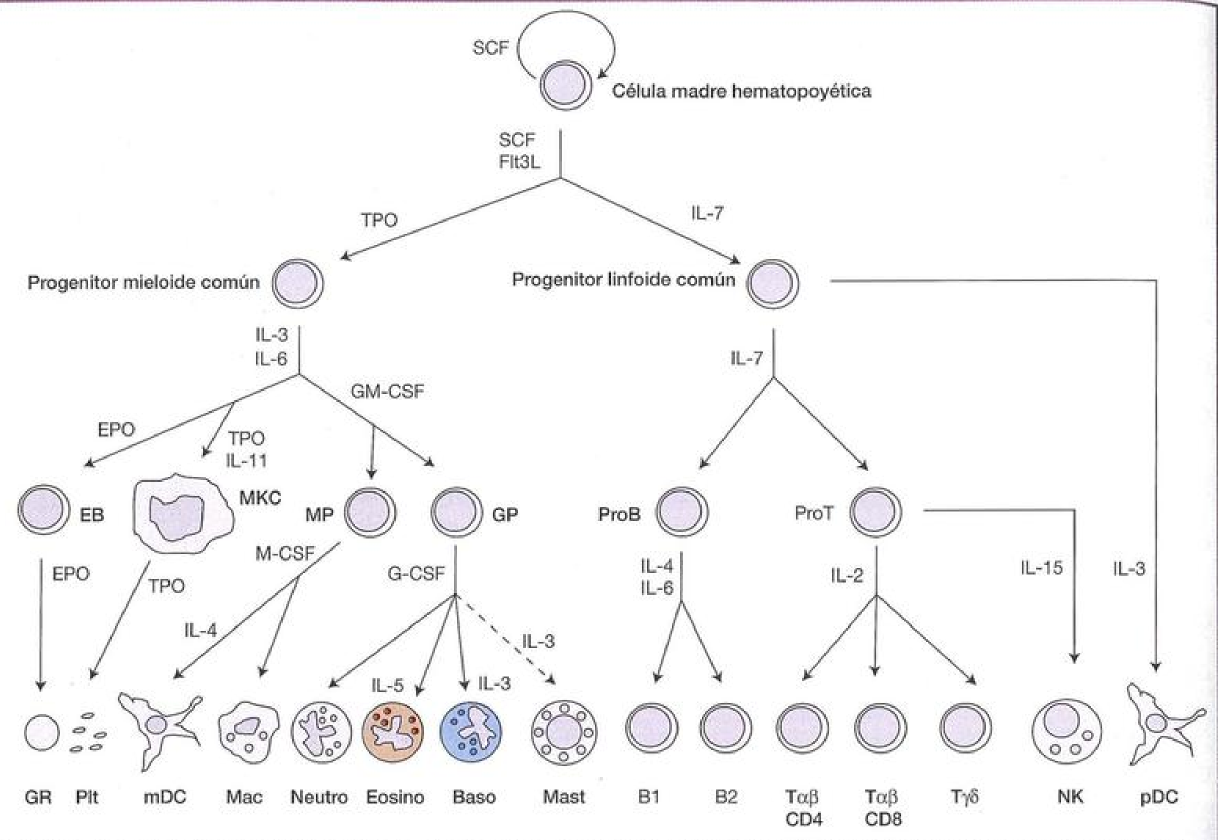


Figura 11.1. La célula hematopoyética pluripotente y su progenie que se diferencia por el influjo de una serie de factores de crecimiento solubles en el microambiente de la médula ósea.

La expresión de los diversos factores de transcripción nuclear dirige el proceso de diferenciación. Por ejemplo, el gen *Ikaros* codifica un factor de transcripción con dedos de cinc que es fundamental para inducir el desarrollo de un precursor mieloide/linfoide común en un progenitor restringido linfoide que da lugar a células T, B y NK. Factores de crecimiento/citocinas: EPO, eritropoyetina; Flt3L, ligando de tirosincinasa 3 similar a FMS; G-CSF, factor estimulador de colonias de granulocitos; GM-CSF, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (denominado así porque estimula la formación de colonias mixtas de estos dos tipos celulares a partir de progenitores de la médula ósea, ya sea en cultivos celulares o en la transferencia a un receptor irradiado donde aparecen en el bazo); IL- 3, interleucina 3 (a menudo denominada multi-CSF porque estimula los progenitores de plaquetas, eritrocitos, todos los tipos de células mieloides y también las células dendríticas plasmacitoides); M-CSF, factor estimulador de colonia de monocitos; SCF, factor de células madre; TPO, trombopoyetina; células: B1 y B2, subpoblaciones de células B; Baso, basófilo; EB, eritroblasto; CLP, progenitor linfoide común; CMP progenitor mieloide común; Eosino, eosinófilo; GP, progenitor de granulocitos; Mac, macrófago; Mast, mastocito; mDC, célula dendrítica mieloide; MKC, megacariocito; MP, progenitor de monocito/macrófago/DC; Neutro, neutrófilo; NK, célula *natural killer*; Pla, plaquetas; pDC, célula dendrítica plasmacitoide; GR, eritrocitos.

tamiento que, además del CD44, incluyen la integrina α_6. Varias quimiocinas también tiene una función esencial, como CXCL12 (factor proveniente de la estroma-1, SDF-1), que es un factor quimotáctico particularmente potente para las células progenitoras $CXCR4^+$ en el ser humano.

Hormonas tímicas

Además, las células epiteliales del timo producen una serie de hormonas peptídicas que pueden promover la aparición de marcadores de la diferenciación de células T y una diversidad de funciones de estas células T en cultivos con células de médula ósea *in vitro*. Las concentraciones circulantes de esas hormonas *in vivo* comienzan a reducirse a partir de la pubertad y alcanzan cantidades mínimas a la edad de 60 años. Muchas ya han sido bien caracterizadas y secuenciadas satisfactoriamente, como la timulina, la timosina α_1, el factor humoral tímico (THF, *Thymic humoral factor*) y la timopoyetina (y su pentapéptido timopontina, TP-5). De ellas, sólo la timulina es de origen tímico exclusivo. Este nonapéptido dependiente del cinc tiende a normalizar el equilibrio de las respuestas inmunitarias: restaura la avidez del anticuerpo y la producción de anticuerpos en los ratones viejos y aún estimula la actividad supresora en los animales con anemia hemolítica autoinmunitaria inducida por reacción cruzada con eritrocitos de rata. La timulina puede compararse con una hormona verdadera, ya que es secretada por el timo de un modo regulado y actúa a distancia como un inmunorregulador fisiológico delicado que contribuye al mantenimiento de la homeostasis de la subpoblación de células T.

Interacciones celulares en el timo

Las grandes células epiteliales especializadas de la corteza externa, conocidas como "células nodriza" (Figura 11.2b), se

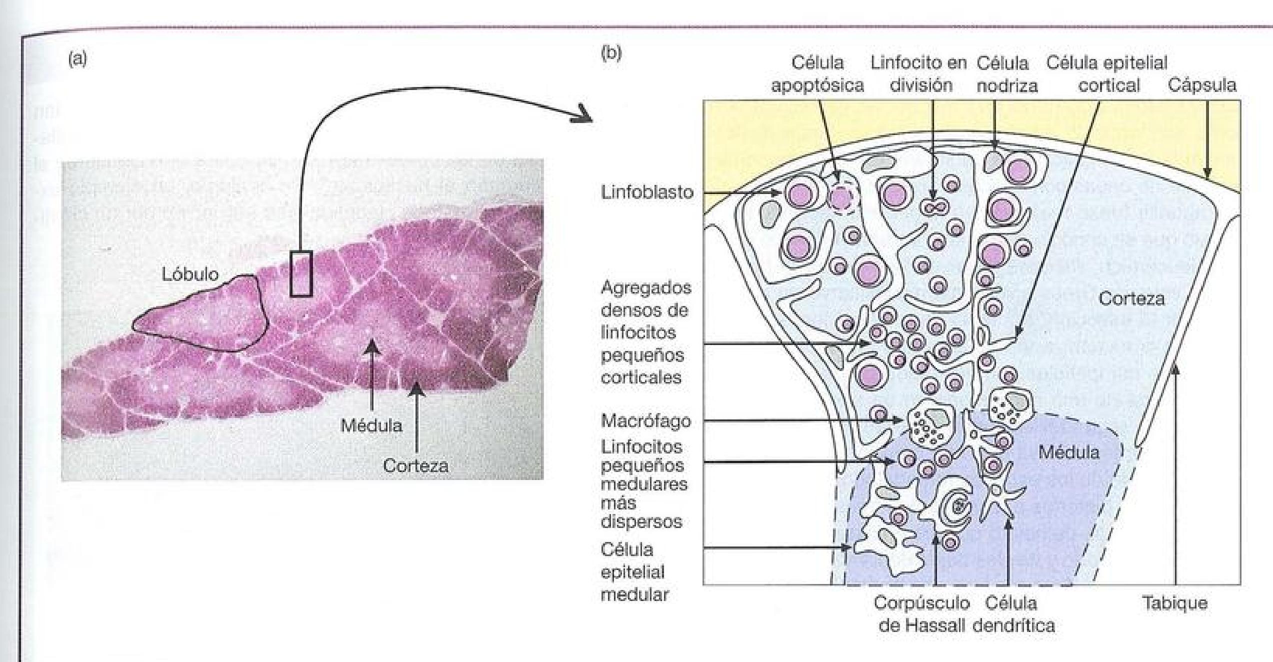


Figura 11.2. Timo.

a) El timo está parcialmente dividido en lóbulos por tabiques de tejido conectivo. Obsérvese la corteza externa diferenciada y la médula interna evidente dentro de cada lóbulo. (Cortesía de Rand S. Swenson, Dartmouth Medical School, http://www.dartmouth.edu/eanatomy/Histo) b) Características celulares de un lóbulo tímico. Véase el texto para la descripción. (Adaptado de Hood L.E., Weissman I.L., Wood W.B. & Wilson J.H. (1984) *Immunology*, 2ª ed, p. 261. Benjamin Cummings, California.)

asocian con grandes cantidades de linfocitos que yacen dentro de bolsillos producidos por extensiones largas de la membrana de esas células. Las células epiteliales de la corteza profunda presentan prolongaciones dendríticas ramificadas, con alto contenido de moléculas de clase II del CMH, y se conectan mediante uniones celulares especializadas, denominadas desmosomas, para formar una red a través de la cual deben pasar los linfocitos corticales en su camino hacia la médula del timo. Los linfocitos corticales se encuentran densamente compactados en comparación con los de la médula (figura 11.2a); muchos están en división, y una cantidad importante experimenta apoptosis. En su trayecto hacia la médula, los linfocitos atraviesan un cordón de macrófagos "centinela" en la unión corticomedular. Las células dendríticas provenientes de la médula ósea están presentes en la médula tímica, y las células epiteliales tienen prolongaciones más extensas que sus equivalentes corticales y expresan niveles elevados de moléculas de clases I y II del CMH. Las células verticiladas queratinizadas epiteliales en la médula forman los característicos corpúsculos del Hassall (Figura 11.2b), muy apreciados por los anatomopatólogos. Estas estructuras sirven como un sistema para deshacerse de los timocitos agonizantes, tal vez tras la fagocitosis por las células dendríticas, y son el único sitio donde se encuentran las células apoptósicas en la médula.

Existe una relación bastante compleja entre los sistemas nervioso y endocrino; el timo está profusamente inervado con fibras adrenérgicas y colinérgicas. Tanto los timocitos como las células de la estroma del timo expresan receptores para varios neurotransmisores y neuropéptidos. La somatostatina es expresada por las células corticales y medulares del epitelio tímico y puede inducir la migración de los timocitos que expresan el receptor para este neuropéptido. Las hormonas glucocorticoides, como la hidrocortisona (cortisol) y la cortisona, clásicamente asociadas con la glándula suprarrenal, también son elaboradas por las células epiteliales tímicas. Durante el estrés, aumenta el flujo de esas hormonas y causan directamente la involución del timo y la apoptosis de los timocitos. Asimismo, las hormonas sexuales testosterona, estrógeno y progesterona pueden estimular la involución tímica.

En los seres humanos, la involución del timo comienza naturalmente en el curso de los primeros 12 meses de vida y se reduce al espacio epitelial tímico, donde se generan las células T. Esta disminución continúa a lo largo de toda la vida, con una reducción estimada a razón de un 3% por año hasta la edad adulta (35-45 años) y en el 1% más adelante. En realidad, es en los primeros 12 meses de vida cuando la producción de células T es más vigorosa. El tamaño del órgano no brinda ningún indicio de estos cambios, porque es remplazado por tejido conectivo y adiposo. En cierto sentido, se puede prescindir progresivamente del timo porque, como veremos, establece una dotación de células T periféricas de larga duración que le permiten al huésped resistir la pérdida de la glándula sin una insuficiencia catastrófica de la función inmunitaria; una prueba de ello son los mínimos efectos de la timectomía en el adulto en comparación con la **influencia profunda en el neonato** (Avances y descubrimiento 11.1). No obstante, el timo adulto conserva un residuo de tejido corticomedular que contiene subpoblaciones de timocitos con un amplio espectro de reordenamientos del gen TCR. Los pacientes adultos que reciben médula ósea carente de células T o células madre hematopoyéticas de la sangre periférica después del tratamiento de ablación son capaces de generar nuevas células T vírgenes en una proporción que está relacionada de manera inversa con la edad del individuo. Estas observaciones establecen que se

Avances y descubrimientos 11-1—Función inmunitaria del timo

Ludwig Gross descubrió que una forma de leucemia murina podía ser inducida en cepas con índices bajos de leucemia mediante la inoculación de un filtrado de tejido leucémico proveniente de cepas con índices elevados de leucemia, siempre que aquélla fuese realizada en el período neonatal inmediato. Puesto que se conocía que el timo estaba vinculado con el proceso leucémico, Jacques Miller decidió probar la hipótesis de que el virus de Gross sólo podía multiplicarse en el timo neonatal por la infección de cepas de ratones con bajo índice de leucemia timectomizados en el período neonatal. Los resultados fueron compatibles con esa hipótesis pero, extrañamente, los animales de una cepa murieron de una enfermedad consuntiva que según Miller podría haberse debido a la susceptibilidad a la infección, ya que murieron menos ratones cuando se los trasladó de los establos remodelados para caballos que servían como bioterios a alojamientos "más higiénicos".
En la autopsia se demostró que los animales presentaban tejido linfoide atrofiado y niveles bajos de linfocitos en la sangre, y Miller decidió verificar su inmunocompetencia antes del comienzo de la enfermedad consuntiva. Para su asombro, los injertos cutáneos, incluso de ratas (Figura A11.1.1), así como de otras cepas de ratones, fueron totalmente aceptados. Estos fenómenos no fueron inducidos por la timectomía más adelante en la vida, y al escribir sus resultados preliminares en 1961 (Miller J.F.A.P., *Lancet*, ii, 748-749), el autor sugirió que "durante la embriogénesis, el timo produciría las células que darían origen a células competentes desde el punto de vista inmunitario, muchas de las cuales habrían migrado a otros sitios en el período cercano al nacimiento". En conjunto, un ejemplo extraordinario del método científico y su aplicación por un científico de alto vuelo.

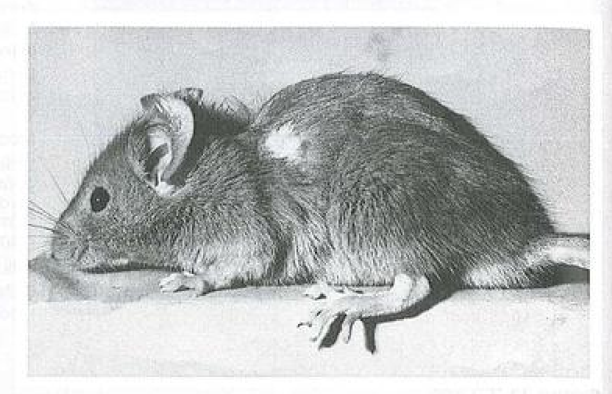


Figura A11.1.1. Aceptación de un injerto cutáneo de rata por un ratón que había sido timectomizado en el período neonatal.

generan células T nuevas en la vida adulta, si bien es cierto que en una proporción menor que durante los primeros años de vida.

Las células madre de la médula ósea se transforman en células T inmunocompetentes en el timo

La evidencia de esto proviene de los experimentos de reconstitución en los huéspedes irradiados. Un animal irradiado es recuperado mediante injertos de médula ósea a través de la reposición inmediata de precursores de granulocitos, y en el largo plazo, también a través de la reconstitución de las células T y B destruidas por irradiación. Sin embargo, si se timectomiza al animal antes de la irradiación, las células de la médula ósea no repondrán la población de linfocitos T (véase la Figura 6.42).

Alrededor del día 11-12, en el embrión murino las células madre linfoblastoides provenientes de la médula ósea comienzan a colonizar la periferia del rudimento epitelial del timo. Si éste se extirpa en esa etapa y se incuba en un cultivo del órgano, se generará una variedad completa de linfocitos T maduros. Esto no se observa si se cultivan timos de 10 días, y revela que la colonización por linfoblastoides da lugar a una progenie de linfocitos pequeños inmunocompetentes.

Ontogenia de las células T

La diferenciación se acompaña de cambios en los marcadores de superficie

Los progenitores de las células T que llegan de la médula ósea ingresan en el timo a través de vénulas que se encuentran en la unión corticomedular. Las células T que se desarrollan en el timo se denominan timocitos. Estos timocitos tempranos carecen de correceptores CD4 y CD8 y, por consiguiente, se denominan **células doble negativas** (DN) (Figura 11.3). Sin embargo, expresan el receptor para quimiocina CCR7 y, por la influencia de quimiocinas como CCL19 y CCL21, migran a través de la corteza del timo hacia la zona subcapsular externa antes de que expresen un TCR generado al azar y también cambian la expresión de CD4 y de CD8 para convertirse en células **doble positivas** (DP). Más tarde, sufren un proceso denominado como instrucción tímica, que comprende dos pasos, de selección positiva y de selección negativa (Figura 11.3), para asegurar que las células CD4 o CD8 **simple positivas** (SP) que salen del timo posean un TCR que pueda reconocer los péptidos derivados de los antígenos extraños presentados por las variantes del CMH del propio individuo.

Las más tempranas de estas células progenitoras, las células DN1 (Figura 11.4), mantienen la pluripotencialidad, expresan todavía el marcador de la célula madre CD34, y también expresan niveles elevados de la molécula de adhesión CD44 y el receptor para el factor de la célula madre (*stem cell factor*, SCF) (c-kit, CD117). Cuando maduran en células DN2, pierden la expresión de CD34 y comienzan a expresar la cadena α para el receptor de IL-2 (CD25). Estas células están restringidas a la producción de células T y células dendríticas linfoides. El desarrollo de la célula T se halla intensamente alterado en los ratones obtenidos por desactivación génica *Notch-1*$^{-/-}$; la señalización Notch-1 es necesaria para la asignación del linaje de las células T DN1 y DN2. En realidad, los ligandos Notch-1, con los nombres bastante exóticos de Jagged-1, Jagged-2, δ-tipo-1 y δ-tipo-4, se expresan en las células del epitelio tímico de una manera

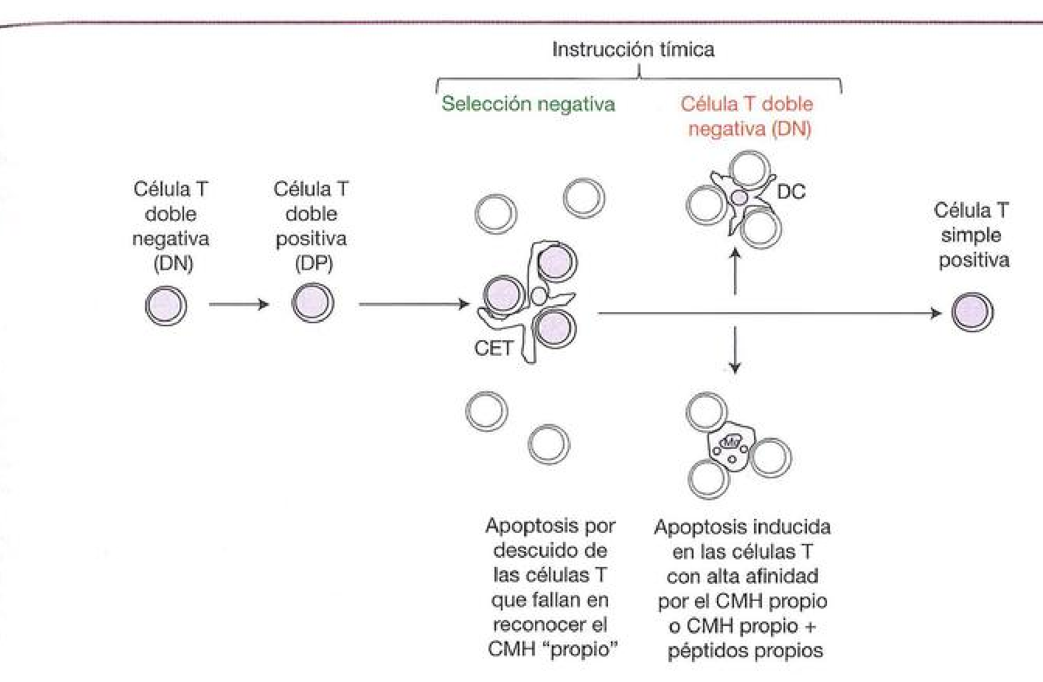


Figura 11.3. Instrucción tímica.

Después de la recombinación productiva de sus genes de cadena α y cadena β del receptor de célula T (TCR), las células expresan un TCR en la superficie celular junto con CD4 y CD8 para convertirse en células doble positivas (DP). La selección positiva en las células epiteliales tímicas (CET), que expresan moléculas tanto de clase I como de clase II del CMH, rescata células de un mecanismo de "defecto" de apoptosis, que ocurriría debido al abandono de estas células. Como ellas han generado un TCR capaz de reconocer el CMH "propio" con afinidad baja o intermedia, son salvadas del abandono y estas células rescatadas son entonces protegidas de la apoptosis a menos que sufran selección negativa debido a la interacción de alta afinidad de sus TCR con el CMH propio o el CMH + péptidos propios presentes en las células dendríticas (DC) y los macrófagos (Mac). Las células T simple positivas (SP) $CD4^+CD8^-$ y $CD4^-$ $CD8^+$ que emigran del timo poseen, por consiguiente, un TCR con el potencial de detector péptidos extraños presentados por el CMH "propio".

altamente regulada. La diferenciación ulterior en células DN3 y la inhibición de la expresión de CCR7 acompañan su arribo a la zona subcapsular. La expresión transitoria de los genes activadores de la recombinasa *RAG-1* y *RAG-2*, junto con un aumento en la accesibilidad de la cromatina alrededor de un alelo de los genes de la cadena γ y de la cadena δ del TCR γ o de la cadena β del TCR durante los estadios de DN2 y DN3, da por resultado la asignación al linaje de las células T. La expresión de CD3, el complejo de la señal de transducción invariable del TCR, tiene lugar en este estadio, mientras se pierden CD44 y c-kit. Las células T γδ se diversifican en este punto. La pérdida ulterior de CD25 significa el paso de precursores de células T αβ a la población DN4, que con posterioridad se diferencia en timocitos **doble positivos** (DP) $CD4^+$ (el marcador para las moléculas de reconocimiento de clase II del CMH) y $CD8^+$ (moléculas de reconocimiento de clase I). El reordenamiento del gen de la cadena α del TCR ocurre cuando RAG-1 y RAG-2 se expresan transitoriamente de nuevo en cualquiera de las células DN4 o inmediatamente después de la expresión de CD4 y CD8. Los timocitos DP comienzan a expresar otra vez cantidades elevadas de CCR7 y determinan que migren a través de la corteza, atraviesen la unión corticomedular y lleguen a la médula. Los marcadores CD4 y CD8 se segregan en forma paralela a la diferenciación en poblaciones inmunocompetentes separadas de precursores de células T **simple positivas** (SP) $CD4^+$ (en su mayoría, T *helper*) y **precursores de células T $CD8^+$** (principalmente **citotóxicas**).

Además de los factores mencionados, el desarrollo de timocitos depende estrechamente de la IL-7, producida por las células del epitelio tímico y necesaria para la transición al estadio DN3. La señalización a través del receptor de IL- 7 y c-kit también ayuda a dirigir la abundante proliferación temprana que sucede en los timocitos antes del reordenamiento de los genes del TCR; la linfopoyetina de la estroma tímica (TSLP, *lymphopoietin of stromal thymic*) actúa como un ligando adicional para la cadena α del receptor de IL-7. SCF, IL-7 y TSLP son ayudadas y estimuladas en esta tarea por las moléculas solubles de la familia Wnt producidas por el epitelio tímico, que son reconocidas por complejos de receptores de los timocitos y consisten en receptores de la familia Frizzled junto con las proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteína de baja densidad LRP5 o LRP6. Esta estimulación también colabora en la diferenciación de timocitos y causa la sobreexpresión de las moléculas de adhesión necesarias para la migración ordenada de los timocitos sensibles a la quimiocina a través del timo. Las células γδ permanecen como doble negativas, es decir $CD4^-8^-$, salvo para una pequeña subpoblación que expresa CD8.

Los factores que determinan si las células doble positivas se transformarán en células simple positivas $CD4^+$ restringidas por las moléculas de clase II o $CD8^+$ restringidas por

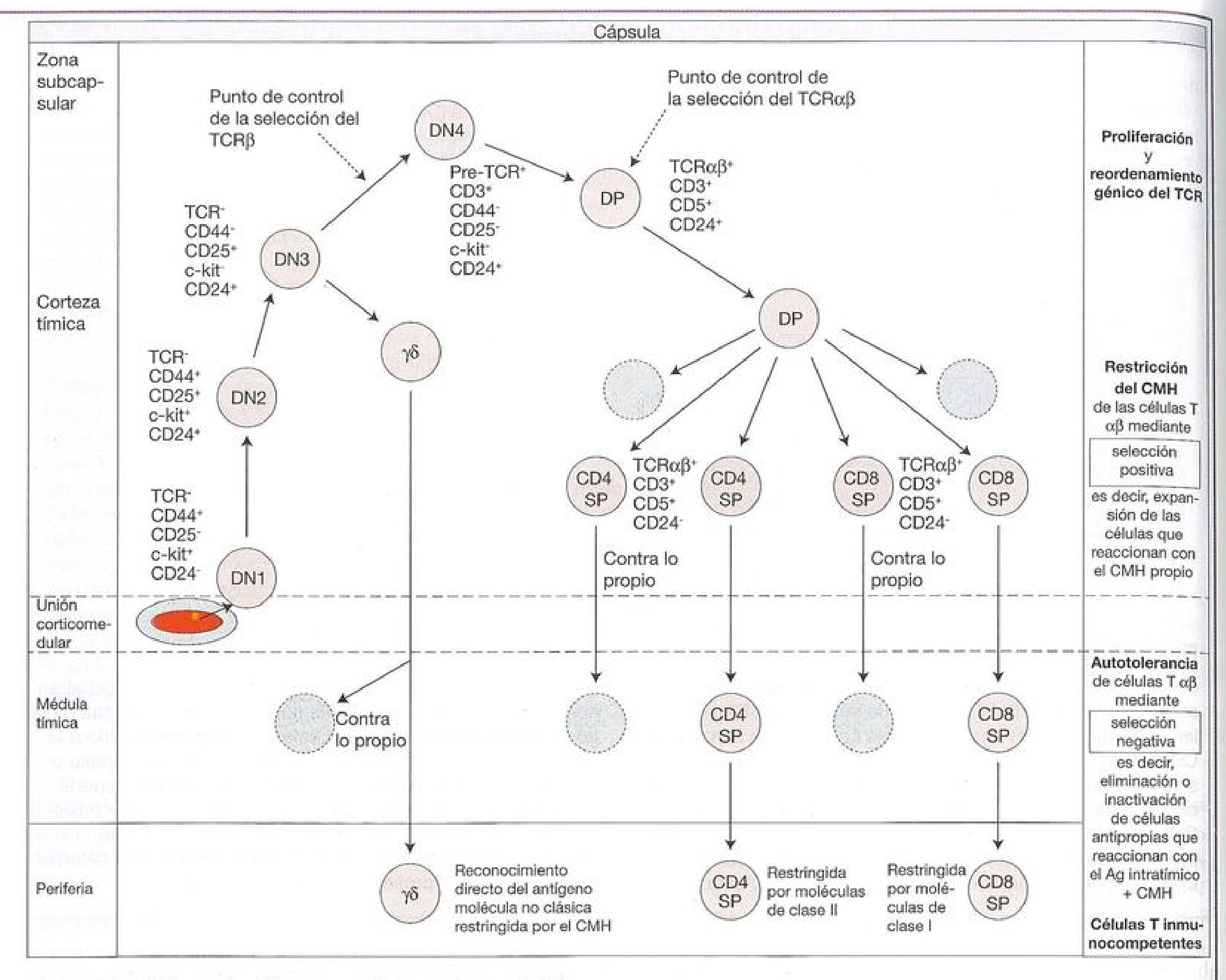


Figura 11.4. Diferenciación de las células T dentro del timo.

Los precursores de células T que provienen de la médula ósea ingresan al timo por los vasos sanguíneos de la unión corticomedular. La transición entre las diferentes poblaciones de precursores de células T CD4⁻CD8⁻ (doble negativas, DN) en el timo está marcada por la expresión diferencial de CD44, CD25, c-kit y CD24. Las células DN3 son incapaces de progresar a la fase de DN4 a menos que reordenen con éxito uno de sus dos loci del gen de la cadena β del TCR. El reordenamiento adecuado de la cadena α del TCR para formar el receptor maduro es obligatorio con miras a la diferenciación posterior de la fase temprana de CD4⁺CD8⁺ (doble positivo, DP). Las células T doble positivas que portan un TCR αβ están sujetas a procesos de selección positiva y negativa, las células T "inútiles" (es decir, aquellas incapaces de reconoce el CMH propio) que mueren por abandono durante la selección positiva y las células autorreactivas seleccionadas negativamente se indican en gris. Las células autorreactivas con especificidad para antígenos propios no expresados en el timo pueden convertirse en tolerantes por el contacto periférico extratímico con el antígeno. Las células γδ, que se desarrollan a partir de los precursores de células T DN3, parecen reconocer el antígeno sobre todo directamente, de una manera análoga a la molécula del anticuerpo sobre la célula B, aunque algunos pueden estar restringidos por las moléculas similares a las no clásicas del CMH. No están bien caracterizados los detalles y la localización de los procesos de selección positivos y negativos para las células T γδ. Las células NKT, que no se muestran en el diagrama para mayor claridad, se originan a partir de las células T doble positivas para convertirse en células CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁺ o CD4⁻CD8⁻ que portan un TCR αβ invariable y un marcador NK1.1 (véase p. 135), por lo general restringidos por CD1d.

las moléculas de clase I en el timo aún no han sido esclarecidos por completo. Existen dos hipótesis principales. La **hipótesis estocástica** o **de selección** sugiere que la expresión del correceptor CD4 o CD8 es inhibida al azar y se seleccionan luego células que tienen una combinación de TCR-correceptor capaz de reconocer un péptido-CMH adecuado para la supervivencia. Por el contrario, la hipótesis **instructiva** establece que la interacción del TCR con el péptido-CMH origina señales que instruyen a las células T para inhibir la expresión del correceptor "inútil", incapaz de reconocer esa clase particular del CMH. Para tratar de reconciliar el hecho de que hay datos que respaldan ambas hipótesis, se han presentado varios otros modelos que incluyen propuestas en las que la **potencia de la señal más intensa o la duración de la señal más prolongada** favorecen el desarrollo de la célula CD4. Estos diferentes modelos son todavía tema de debate entre la comunidad de inmunólogos. No obstante, lo que está bastante claro es

que la expresión de los factores de transcripción Th-POK, TOX y GATA-3 son importantes para el desarrollo de células T CD4+, mientras que la producción del factor de transcripción RUNX3 favorece el desarrollo de células T CD8+.

Las células NKT constituyen una subpoblación definida de células T αβ

Estas células, que derivan de las células T convencionales en el estadio doble positivo del desarrollo del timocito, expresan marcadores asociados con las células T y NK, como TCR y receptores de tipo lectina NK1.1, respectivamente. El TCR de las células NKT está compuesto sobre todo por una cadena α invariable de TCR (Vα14Jα18 en los ratones, Vα24J18 en el ser humano) junto con una cadena Vβ8 (ratón) o Vβ11 (ser humano). Reconocen glucolípidos como la isoglobotrihexosilceramida (iGb3) lisosómica endógena y el antígeno microbiano manósido de fosfatidilinositol de las micobacterias. Estos antígenos son presentados al TCR invariable por la molécula no polimorfa CD1d similar a la clase I del CMH, y al activarse, las células NKT secretan grandes cantidades de citocinas como IFNγ e IL-4, es decir, citocinas del tipo Th1 y Th2. Se ha propuesto que las células NKT pueden actuar sobre todo como células reguladoras.

Reordenamiento del receptor

El reordenamiento de los genes de las regiones *V*, *D* y *J* es requerido para generar el TCR. Alrededor del día 15 del desarrollo fetal, pueden detectarse células con TCR γδ en el timo del ratón, seguido pronto por la aparición de una versión de "**pre-TCR**" del TCR αβ. Las señales Notch-1 (¡de nuevo!) parecen desempeñar una función en la asignación del linaje αβ o γδ, si bien aún se están investigando los detalles.

Desarrollo de los receptores αβ

El gen de la cadena β del TCR suele reordenarse en el estadio de DN3 y se asocia con una cadena pre-α invariable, pTα, para formar un "pre-TCR", el reordenamiento funcional de la cadena β requerido para la transición al estadio de DN4 (Figura 11.4). La señalización a través del pre-TCR se produce de una manera independiente del ligando por la cual las moléculas pre-TCR se dirigen constitutivamente a las balsas lipídicas. La activación de las cascadas de señalización en las que intervienen las vías Ras/MAPK y fosfolipasa Cγ1 recluta Ets-1 y otros factores de transcripción, que estimulan la proliferación y la diferenciación de células DN3 en DN4 y después en células DP, e igualmente median la inhibición por retroalimentación sobre el reordenamiento adicional del gen Vβ del TCR. El desarrollo posterior de las células pre-T requiere el reordenamiento de los segmentos génicos **Vα** y permite la formación del TCR αβ maduro.

El reordenamiento de los genes Vβ en la cromátide hermana es suprimido tras la expresión del pre-TCR (recuérdese que cada célula contiene dos cromosomas para cada agrupamiento α y β). Así, cada célula sólo expresa una única cadena β TCR, y el proceso por el cual son suprimidos los genes homólogos en la cromátide hermana se denomina **exclusión alélica**. Esta exclusión se debe, al menos en parte, a la metilación de las histonas que mantiene la estructura cerrada de la cromatina, lo cual evita el acceso de las recombinasas a los segmentos génicos del TCR en el alelo excluido.

Las cadenas α no siempre están excluidas alélicamente, de modo que muchas células T inmaduras en el timo tienen dos receptores específicos para el antígeno, cada uno con su propia cadena α pero que comparten una cadena β común. Sin embargo, la expresión de una de las cadenas α suele perderse durante la maduración de la célula T y deja a la célula con una única especificidad TCR αβ. No obstante, alrededor del 1-8% de las células T periféricas tanto en ratones como en seres humanos tienen TCR de la superficie celular que tienen la misma cadena β, pero pueden emplear una de las dos cadenas α diferentes. Estas células T con especificidad dual pueden ampliar el repertorio de TCR para incluir el reconocimiento de péptidos antigénicos extraños que de otro modo no serían seleccionados en el timo.

Desarrollo de receptores γδ

A diferencia del TCR αβ, el TCR γδ en muchos casos parece unirse directamente al antígeno sin necesidad de su presentación por moléculas del CMH o similares al CMH, es decir, reconoce el antígeno de un modo parecido al anticuerpo. El linaje γδ no produce un "prerreceptor", y los ratones que expresan transgenes γ y δ reordenados no reordenan ningún segmento génico γ δ adicional, lo cual indica la exclusión de los genes de la cromátide hermana.

Las células T γδ en el ratón, a diferencia de las de los seres humanos, predominan en asociación con las células epiteliales. Una característica curiosa de las células que abandonan el timo fetal es la restricción en la utilización del gen *V*. Prácticamente la totalidad de la primera ola de células γδ fetales expresan Vγ5 y colonizan la piel; la segunda ola utiliza predominantemente Vγ6 y coloniza el útero en la hembra. En la vida adulta, existe una mayor diversidad del receptor debido a un grado alto de variación en la unión, aunque las células intraepiteliales en el intestino utilizan de modo preferente Vγ4, y las del tejido linfoide encapsulado tienden a expresar Vγ4, Vγ1, Vγ2. Debe advertirse que, para confundir a todos, existen otras nomenclaturas que consideran la numeración de los genes Vγ murinos individuales. El conjunto Vγ en la piel prolifera fácilmente y secreta IL-2 con la exposición a queratinocitos sometidos al choque térmico, lo cual implica su participación en la vigilancia de señales en los traumatismos. Las célula T γδ en el tejido linfoide periférico responden bien al antígeno PPD (derivado proteico purificado) de la tuberculosis y a epítopos conservados de la proteína micobacteriana y del choque térmico propia hsp65. Sin embargo, los datos provenientes de ratones obtenidos por desactivación génica para TCR γδ sugieren que en conjunto las células T γδ, en el adulto, pueden hacer una contribución menor a la protección específica contra patógeno. Por consiguiente, se propuso que su función principal sería la regulación de las células T β, en la cual la mayoría de las células T γδ se desvía hacia un patrón de secreción de citocina Th1.

Ratones timectomizados b × k	Injerto con timo de haplotipo	Irradiado y reconstituido con médula ósea b × k	Cebado con KLH	Respuesta proliferativa de células T cebadas contra KLH en las células presentadoras de antígeno de haplotipo	
				H-2b	H-2k
	b × k	→		++	++
	b	→		++	–
	b tratado con dGuo	→		++	–
	k	→		–	++
	k tratado con dGuo	→		–	++

Figura 11.5. Sellado *(imprinting)* de la restricción de las células T *helper* H-2 por el haplotipo del timo.

Los ratones huéspedes fueron cruzados F1 entre cepas de haplotipo $H\text{-}2^b$ y $H\text{-}2^k$. Se timectomizaron e injertaron con timo fetal de 14 días, se los irradió y se los reconstituyó con médula ósea F1. Después de la sensibilización (cebado) con el antígeno hemocianina de lapa (KLH), se evaluó la respuesta proliferativa de las células T de ganglio linfático contra KLH en las células presentadoras de antígenos de cada haplotipo progenitor. En algunos experimentos, los lóbulos tímicos se cultivaron con desoxiguanosina (dGuo), que destruye las células intratímicas del linaje de macrófagos/ células dendríticas, pero esto no tuvo efecto en la selección positiva. (De Lo D. y Sprent J. [1986] *Nature* **319**, 672-675.)

Dos subconjuntos principales γδ predominan en el ser humano, Vγ9, Vδ2 y Vγ1, Vδ2. El conjunto Vγ9 se eleva del 25% en las células totales γδ en la sangre del cordón a cerca del 70% en la sangre del adulto; al mismo tiempo, la proporción de Vγ1 disminuye del 50% a menos del 30%. La mayoría del conjunto Vγ9 tiene el fenotipo de memoria activado CD45RO, probablemente como resultado de la estimulación por los ligandos comunes para TCR Vγ9, Vδ2, como los componentes antigénicos que poseen fosfato no proteico de micobacterias, *Plasmodium falciparum* y el superantígeno enterotoxina A estafilocócica.

Las células son seleccionadas positivamente para la restricción del CMH propio en el timo

La capacidad de las células T para reconocer los péptidos antigénicos asociados con el CMH propio se desarrolla en el timo. Si un animal F1 ($H\text{-}2^k \times H\text{-}2^b$) es sensibilizado contra un antígeno, las células T programadas pueden reconocer ese antígeno en las células presentadoras del haplotipo $H\text{-}2^k$ o $H\text{-}2^b$, es decir que las células pueden utilizar cualquiera de los haplotipos de los progenitores como elemento de restricción para el reconocimiento. Sin embargo, si se emplean células de la médula ósea del F1 ($H\text{-}2^k \times H\text{-}2^b$) para reconstituir un F1 irradiado que antes había sido timectomizado y trasplantado con un timo $H\text{-}2^k$, las células T sensibilizadas sólo pueden reconocer con posterioridad antígenos en el contexto de $H\text{-}2^k$, no de $H\text{-}2^b$ (Figura 11.5). En consecuencia, es **el fenotipo del timo el que sella la restricción H-2** en la diferenciación de las células T.

También se verá en la Figura 11.5 que la incubación del injerto de timo con desoxiguanosina, que destruye las células del linaje de macrófagos y dendríticas, no tiene efecto en el sellado (*imprinting*), lo que sugiere que esta función es llevada a cabo por las células epiteliales. La confirmación proviene de un estudio en el que ratones $H\text{-}2^k$ irradiados en forma letal, reconstituidos con médula ósea F1 (b × k) y luego inoculados de modo intratímico con una línea de células epiteliales tímicas $H\text{-}2^b$ formaron células T restringidas por el haplotipo *b*. Las células epiteliales tienen en la superficie un alto contenido de moléculas del CMH, y el criterio actual es que las células T doble positivas ($CD4^+8^+$), que poseen receptores que reconocen el CMH propio en las células epiteliales, son seleccionadas positivamente para la diferenciación en células simples positivas $CD4^+8^-$ o $CD4^-8^+$. Los datos provienen en gran medida de estudios realizados en ratones transgénicos. Como éste es un tema de investigación activa, nos gustaría citar algunos ejemplos experimentales, algo complejos para el lector no profesional.

Un estudio muy sofisticado comienza con un clon de células T citotóxicas originadas en hembras $H\text{-}2^b$ contra células masculinas de la misma cepa. El clon reconoce el antígeno masculino, H-Y, y esto se observa en asociación con las moléculas propias H- $2D^b$ del CMH, es decir, reacciona con el complejo $H\text{-}2^b$/Y. Las cadenas α y β del receptor de células T de este clon se introducen ahora como transgenes en ratones con IDCG que carecen de la capacidad de reordenar sus propios genes de receptores de regiones variables de la línea germinal; así, el único TCR que posiblemente podría expresarse es el codificado por los transgenes, por supuesto siempre que estudiemos hembras en lugar de

machos, en los que el clon sería eliminado por autorreactividad. Si las hembras transgénicas con IDCG portan el haplotipo original $H\text{-}2^b$ (p. ej., híbridos F1 entre haplotipos $b \times d$), el receptor anti-H-2^b/Y será ampliamente expresado en las células citotóxicas precursoras $CD8^+$ (Cuadro 11.2a), mientras que los transgénicos H-2^d que carecen de H-2^b producirán sólo timocitos doble positivos $CD4^+8^+$ sin células simples $CD4^+8^-$ o $CD4^-8^+$. Así, a medida que las células $CD4^+8^+$ expresan su transgén de TCR, sólo se diferencian en células inmunocompetentes $CD8^+$ si entran en contacto con las células epiteliales tímicas del haplotipo del CMH reconocido por su receptor. Decimos que estos timocitos que reconocen lo propio son **seleccionados de modo positivo**. Los fenómenos intracelulares positivos acompañan el proceso de selección positiva ya que se activan las tirosincinasas fyn y lck en los timocitos positivos dobles $CD4^+8^+$ que maduran a células positivas simples $CD8^+$ en el haplotipo *b de base*, si bien son menores en las células que no se diferencian en células maduras en el haplotipo *d* no selectivo.

En otro ejemplo, los genes que codifican un receptor αβ de un clon de células T *helper* (2B4), que responden al citocromo *c* de la polilla en asociación con la molécula de clase II H-$2E\alpha^k$,β^b (recuérdese que el H-2E tiene una cadena α y β), son transfectados en ratones H-2^k y H-2^b. Por razones irrelevantes, los ratones H-2^k expresan la molécula H-2E en la superficie de las células presentadoras de antígeno, pero los H-2^b no lo hacen. En el estudio, la frecuencia de las células T $CD4^+$ circulantes que contienen el receptor 2B4 fue 10 veces mayor en las cepas H-2^k que en las H-2^b, lo cual habla de nuevo de la selección positiva de los timocitos doble positivos que reconocen su propio CMH tímico. Otro rasgo característico adicional de la historia es que la selección positiva sucedió sólo en ratones manipulados para expresar H-2E en sus células epiteliales corticales en lugar de hacerlo en sus células epiteliales medulares, y ello demuestra que este paso de la diferenciación se efectúa antes de que los timocitos en desarrollo alcancen la médula ("¡Léelo otra vez, Sam!", podría haber dicho Humphrey Bogart) .

Cuadro 11.2. Selección positiva y negativa en ratones transgénicos con inmunodeficiencia combinada grave (IDCG) que tienen receptores αβ de un clon de células T H-$2D^b$ citotóxicas para el antígeno masculino H-Y, o sea, el clon es de haplotipo H-2^b y es femenino antimasculino. a) Las únicas células T son aquellas que presentan el TCR transgénico ya reordenado, dado que los ratones con IDCG no pueden reordenar sus propios genes V. Los clones sólo se expanden más allá del estadio $CD4^+8^+$ cuando son seleccionados de manera positiva por el contacto con el haplotipo (H-2^b) del CMH reconocido por el clon original del cual derivó el transgén. Asimismo, como el TCR reconoció la clase I, sólo se seleccionaron las células $CD8^+$. b) Cuando el clon transgénico antimasculino es expresado en las células T intratímicas en un ambiente masculino, la enérgica ocupación del TCR con las células que portan el antígeno masculino las eliminan. (Basado en los datos de von Boehmer H. y cols. [1989]. En Metchers F. y cols. [eds] *Progress in Immunolgy* 7, p. 297. Springer-Verlag, Berlín.) +, medición sin analizar de los números relativos de células T en el timo que tiene el fenotipo indicado.

Fenotipo de los timocitos	(a) Selección positiva		(b) Selección negativa	
	Haplotipo de las hembras transgénicas		Ratón transgénico H-2^b	
	$H\text{-}2^{b/d}$	$H\text{-}2^{d/d}$	Machos	Hembras
$CD4^-8^-$ TCR^-	+	++	+++	+
$CD4^+8^+$ $TCR^\pm$	++	+	–	+++
$CD4^-8^+$ TCR^{++}	+	–	–	+
$CD4^+8^-$ TCR^{++}	–	–	–	–

Tolerancia de las células T

La inducción de tolerancia inmunitaria es necesaria para evitar la autorreactividad

En esencia, los linfocitos utilizan receptores que reconocen antígenos extraños a través de la complementariedad de la forma mediada por las fuerzas intermoleculares que describimos antes. En gran medida, los ladrillos utilizados para construir las moléculas microbianas y las del huésped son los mismos, y de este modo son las formas ensambladas de las moléculas de lo *propio* y lo *no propio* las que deben ser discriminadas por el sistema inmunitario si ha de evitarse una autorreactividad posiblemente desastrosa. La restricción de cada linfocito a una única especificidad simplifica mucho el trabajo de establecer la autotolerancia, simplemente porque apenas requiere un mecanismo que anule desde el punto de vista funcional las células autorreactivas y deje el resto del repertorio sin alteraciones. La diferencia más radical entre las moléculas propias y no propias radica en el hecho de que, en la vida temprana, los linfocitos en desarrollo están rodeados por lo propio y, comúnmente, sólo se encuentran con los antígenos no propios en una etapa más tardía y luego, dentro del contexto de la presencia de adyuvantes y la liberación de citocinas asociadas en general con la infección. La evolución ha aprovechado estas diferencias para establecer el mecanismo de la **tolerancia inmunitaria para los constituyentes del huésped** (Avances y descubrimientos 11.2).

La autotolerancia puede ser inducida en el timo

Como las células T en desarrollo se encuentran en el timo, es previsible que éste sea el medio en el que la exposición a autoantígenos en las células circundantes induce la tolerancia. La expectativa es razonable. Si las células madre de la médula ósea de haplotipo $H\text{-}2^k$ son cultivadas con timo fetal de origen H-2^d, cuando las células maduran se tornan tolerantes al H-2^d, como queda demostrado por su incapacidad

Avances y descubrimientos 11-2—Descubrimiento de la tolerancia inmunitaria

Hace más de 60 años, Owen realizó la intrigante observación de que los bovinos gemelos no idénticos (dicigotos) que compartieron la misma circulación placentaria, y cuyas circulaciones estaban en consecuencia vinculadas, crecieron con apreciables cantidades de eritrocitos del otro gemelo en su sangre; si no hubieran compartido la misma circulación al nacimiento, los eritrocitos del gemelo inyectados en la vida adulta habrían sido eliminados rápidamente por una respuesta inmunitaria. A partir de este hallazgo, Burnet y Fenner concibieron la noción de que los antígenos potenciales que alcanzan las células linfoides durante su fase inmadura del desarrollo inmunitario pueden suprimir de alguna manera cualquier respuesta específica futura contra ese antígeno cuando el animal alcanza la madurez inmunitaria. Los autores consideraron que esto proporcionaría un medio por el cual se podía establecer una falta de respuesta a los constituyentes propios y por eso podría permitir a las células linfoides realizar la importante distinción entre "lo propio" y lo "no propio". Sobre esta base, cualquier célula extraña introducida en el organismo durante el desarrollo inmunitario debe engañar al animal para que la considere como "componente propio" más adelante en la vida, y en los estudios de Medawar y col. se demostró que la **tolerancia inmunitaria,** o falta de respuesta, puede ser inducida artificialmente de esta manera. Así, la inyección neonatal de células de ratón CBA en animales recién nacidos de la cepa A suprime su capacidad de rechazar inmunológicamente un injerto CBA en la vida adulta (Figura A11.2.1). La tolerancia también puede ser inducida con antígenos solubles; por ejemplo, los conejos inyectados en el momento de nacer con albúmina sérica bovina sin adyuvante no elaboran anticuerpos frente a la exposición posterior a esta proteína.

Para mantener la tolerancia, es necesaria la persistencia del antígeno. En los experimentos de Medawar, el estado de tolerancia persistió durante mucho tiempo porque las células de CBA inyectadas sobrevivían y los animales continuaron siendo quiméricos (es decir, tenían ambas células, A y CBA). Con antígenos no vivos, como la albúmina sérica bovina soluble, la tolerancia va perdiéndose de manera gradual; la explicación más probable es que, en ausencia de antígeno, las células inmunocompetentes recientemente reclutadas que se generan durante la vida no son tolerantes. Como el reclutamiento de los linfocitos T recientemente competentes se reduce de modo drástico con la extirpación del timo, es de interés destacar que el estado de tolerancia persiste por más tiempo en los animales timectomizados.

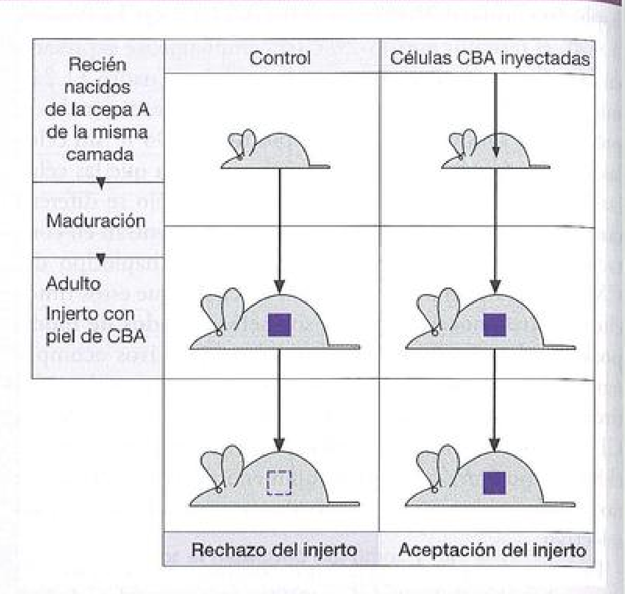


Figura A11.2.1. Inducción de tolerancia contra un injerto extraño de piel de ratones CBA en una cepa A de ratones mediante la inyección neonatal del antígeno.

El efecto es específico del antígeno ya que, normalmente, por lo común los ratones tolerantes pueden rechazar otros injertos. (De Billingham R., Brent L. y Medawar PB. [1953] *Nature* **172**, 603-606.)

La importancia vital de los experimentos de Medawar y su equipo fue la demostración de que puede producirse un estado de tolerancia inmunitaria por la exposición a un antígeno. Como se describirá en el texto, hay una ventana de susceptibilidad para la deleción clonal de los linfocitos T que reaccionan contra lo propio en una fase inmadura en su desarrollo ontogénico dentro del timo (y en el caso de las células B dentro de la médula ósea). Si bien en los modelos animales a menudo es más fácil lograr la tolerancia durante el período neonatal, cuando hay producción intensa de linfocitos vírgenes, la tolerancia puede inducirse durante toda la vida. Obsérvese que las células T en reposo suelen ser tolerantes con más facilidad que las células de memoria.

para dar una respuesta proliferativa mixta de linfocitos cuando se cultivan con estimuladores de fenotipo H-2^d; la capacidad de respuesta a otros agentes no es afectada. Experimentos posteriores en los que fueron tratados timos con desoxiguanosina demostraron que las células responsables de la inducción de la tolerancia eran sensibles a la desoxiguanosina y consistían en macrófagos o células dendríticas derivadas de la médula ósea que abundan en la unión corticomedular (Cuadro 11.3).

La deleción clonal intratímica conduce a la autotolerancia

Existen pocas dudas acerca de que las células T autorreactivas puedan ser eliminadas por métodos físicos dentro del timo. Si se observa el experimento del Cuadro 11.2b, se aprecia que los machos con IDCG portan los transgenes reordenados que codifican el receptor $\alpha\beta$ y reaccionan con el antígeno H-Y de los machos que carecen de células tímicas inmunocompetentes que expresen este receptor, mientras que las hembras sin H-Y sí las poseen. De tal manera, cuando las células T en desarrollo reaccionan con el autoantígeno en el timo, sufren una deleción. En otras palabras, las células autorreactivas experimentan un proceso de **selección negativa** en el timo, que constituye la **tolerancia central** de las células T. La expresión del gen *AIRE* (regulador autoinmunitario) en las células epiteliales de la médula tímica actúa como una llave maestra que dirige la activación transcripcional de los genes para diversos autoantígenos organoespecíficos. La expresión ectópica de estos antígenos causa la eliminación de los timocitos autorreactivos correspondientes. La confirmación de la importancia de expresión de

AIRE para esta deleción clonal provino de experimentos que utilizaron un modelo transgénico doble desarrollado por Goodnow y cols. En estos ratones, una versión unida a la membrana de la lisozima de huevo de gallina (*hen egg lysozime;* HEL) se expresa de modo transgénico como un neoantígeno propio (porque siempre está presente cuando se convierte esencialmente un autoantígeno), y también se generan cantidades elevadas de timocitos específicos para este antígeno por la introducción del TCR relevante como otro transgén. Cuando el transgén HEL se une al promotor de insulina de rata (*rat insulina promotor*, RIP) específico de tejido, la expresión del antígeno "propio" se produce tanto en las células β de los islotes de Langerhans del páncreas *como* en el timo. En ausencia de AIRE, no se cumple en el epitelio tímico la expresión de HEL dirigida por RIP, pero aún tiene lugar en los islotes pancreáticos. Las células T transgénicas en desarrollo que normalmente son eliminadas en el timo escapan a la deleción en ratones deficientes de AIRE y destruyen las células β del páncreas (Figura 11.6).

La deleción de timocitos también se produce cuando las células tímicas contienen ciertos componentes propios que actúan como superantígenos, en este caso porque el antígeno reacciona con una familia completa de receptores Vβ a través del reconocimiento de estructuras invariables en un segmento Vβ. Por ejemplo, los ratones del genotipo *Mls*[a] eliminan las células que portan Vβ6, y el *Mls* es un locus

Cuadro11.3. Inducción de tolerancia en células madre de médula ósea por incubación con macrófagos o células dendríticas sensibles a desoxiguanosina (dGuo) en el timo. Es claro que las células de la médula ósea inducen tolerancia para su propio haplotipo. Así, las células que inducen tolerancia tímica pueden ser reemplazadas por los progenitores en el inóculo de médula ósea (Jenkinson F.J., Jhittay P., Kingston R. y Owen J.J. [1985] *Trasplantation* **39**, 331) o por células dendríticas adultas provenientes del bazo, lo cual demuestra que el estadio de diferenciación de la célula T inmadura más que cualquier naturaleza especial de la célula presentadora de antígeno tímica es lo que conduce a la tolerancia (Matzinger P. y Guerder S. [1989] *Nature* **338**, 74).

Células de médula ósea	Incubación con timo H-2[d]	Inducción de tolerancia al haplotipo *H-2*		
		k	*d*	*b*
k	No tratado	+	+	–
k	Tratado con dGuo	+	–	–
k + d	Tratado con dGuo	+	+	–

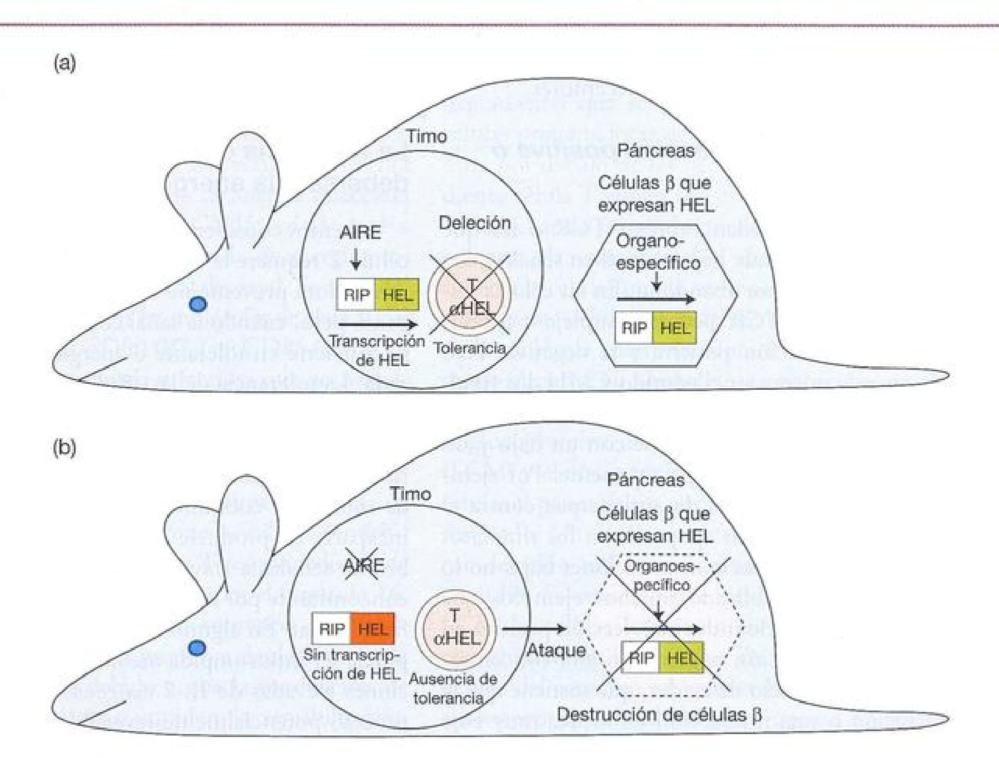


Figura 11.6. AIRE dirige la expresión ectópica de antígenos propios organoespecíficos en el timo.

Se generaron ratones doble transgénicos por el cruzamiento de ratones transgénicos que expresan una forma unida a la membrana de lisozima de huevo de gallina (HEL) bajo el control del promotor de insulina de rata (RIP) con ratones que expresan el TCR transgénico 3A9 αβ para el péptido 46-61 del aminoácido proveniente de la HEL presentado por la molécula de clase II I-A[k] del CMH. Estos ratones normalmente inducen tolerancia a las células T transgénicas en el timo (a), pero esto no sucede si los ratones se vuelven a cruzar con ratones en los cuales se desactivó el gen de AIRE (b). La incidencia de diabetes tipo 1 sufrió un aumento espectacular en ausencia de la expresión de AIRE. (Basado en datos de Liston A. y cols. (2004) *Journal of Experimental Medicine* **200**, 1015-1026.)



Figura 11.7. Microfotografía electrónica de células inducidas a sufrir apoptosis en los lóbulos tímicos fetales intactos después de la exposición a corto plazo al anti-CD3.

A y N indican linfocitos apoptósicos y normales representativos, respectivamente. Obsérvese el estado altamente condensado de los núcleos de los linfocitos apoptósicos. (Cortesía del profesor J.J.T. Owen, de Smith y col. (1989) *Nature* **337**, 181-184. Reproducida con autorización de Macmillan Journals Ltd., London.)

que codifica un superantígeno que induce una proliferación intensa en las células T Vβ6 a partir de una cepa que contiene un alelo *Mls* diferente. Incluso los superantígenos exógenos, como la enterotoxina B estafilocócica que activa las familias de células T Vβ3 y Vβ8 en el adulto, pueden inducir la apoptosis en los estadios tempranos de los timocitos inmaduros que utilizan estas familias de receptores.

Factores que afectan la selección positiva o negativa en el timo

Las células T que no pueden expresar TCR o las que expresan TCR de afinidad muy baja no reciben señales para la supervivencia y mueren por abandono. En las células restantes, la ocupación del TCR por el complejo péptido-CMH determina la selección positiva y la negativa. Pero ¿cómo puede tener la misma señal péptido-CMH dos resultados totalmente diferentes? Lo cierto es que la selección positiva y la negativa pueden producirse con un bajo y un alto grado de ligación al TCR, respectivamente. Por ejemplo, las concentraciones elevadas de anticuerpos contra el CD3 asociado al TCR inducen apoptosis en los timocitos (Figura 11.7), en tanto que las concentraciones bajas no lo hacen. Además, se han publicado muchos ejemplos que indican que el mismo péptido inducirá selección positiva en baja concentración y selección negativa en alta concentración. Esto condujo al modelo de avidez, que sostiene que la falta de interacción o una interacción de avidez muy baja entre la célula T y el péptido-CMH conducirá a la muerte por abandono, una interacción de avidez baja/intermedia seleccionará en forma positiva timocitos doble positivos $CD4^+8^+$, mientras que una interacción de alta avidez conducirá a la deleción clonal. Así, la ocupación del TCR con el CMH propio en las células epiteliales corticales lleva a la expansión y la selección positiva de clones que reconocen el CMH propio, quizá con un espectro completo de afinidades, pero la ocupación del TCR con afinidad alta para el CMH propio (+ el péptido propio) en las células epiteliales medulares y las células dendríticas tendrá como resultado la eliminación y, por lo tanto, a la selección negativa. Aunque aún no se investigó en su totalidad, hay también diferencias evidentes en las vías bioquímicas utilizadas para la señalización positiva y negativa. La selección positiva es sensible a la ciclosporina y dependiente de la vía Ras-MEK-ERK, mientras que la selección negativa es resistente a la ciclosporina e independiente de esta vía. Las diferentes intensidades de señalización del TCR, el Notch y otros receptores pueden influir en la vía utilizada. El factor de transcripción Ikaros parece ser importante en la regulación de la selección negativa, y también colaboraría para determinar si los timocitos DP se transformarán en células SP CD4 o CD8 durante la selección positiva. Por lo tanto, los timocitos de ratones con desactivación génica de Ikaros desarrollan de modo preferencial células SP CD4 en comparación con los timocitos en los ratones intactos desde el punto de vista genético. Permítanos terminar con una nota de advertencia: el modelo de avidez puede ser sustancialmente correcto, pero tal vez sea una simplificación excesiva. Por ejemplo, en el caso de ciertos superantígenos que pueden causar deleción clonal de algunas familias de Vβ, no logran expandirlas incluso en concentraciones muy bajas cuando el modelo habría indicado selección positiva. Este hallazgo dio origen a otros modelos que involucran cambios conformacionales en la interfaz de la unión TCR-péptido-CMH y brindan interacciones complejas de péptidos que se comportan como agonistas parciales y antagonistas; aún no se ha pronunciado la última palabra (¡no es que en la ciencia se haga alguna vez!).

La tolerancia de células T también puede deberse a la anergia clonal

Ya hemos considerado la idea de que la estimulación de la célula T requiere la ocupación del TCR más una señal coestimuladora proveniente de una célula presentadora de antígeno, pero, cuando la señal coestimuladora falta, la célula T se convierte en tolerante o anérgica o, si se prefiere, paralizada. La tolerancia de las células T que se produce fuera del timo se denomina **tolerancia periférica**. Así, la anergia puede ser inducida en las células T por los antígenos periféricos *in vivo* cuando son presentados por células que carecen de moléculas coestimuladoras. Las células T anérgicas son incapaces de producir IL-2, aun cuando con posterioridad brinde señales a través de sus TCR con la coestimulación concomitante por entrecruzamientos del CD28 en su superficie celular. En algunos modelos experimentales, la anergia puede ser interrumpida mediante la provisión de concentraciones elevadas de IL-2 exógena, es decir, la anergia es un proceso potencialmente reversible mientras que la deleción clonal por apoptosis claramente no lo es, dado que las células eliminadas ya no existen más.

El estado anérgico puede incluso transferirse a las células vecinas, un proceso conocido como **anergia infecciosa**. Si un clon de células T *helper* se somete a un experimento de dilución limitante, la unidad mínima de proliferación en respuesta a un péptido en una CPA suele ser de varias células, no solo una. Esto implica que la activación sólo sucede en pequeños grupos o cúmulos de células y sugiere que son

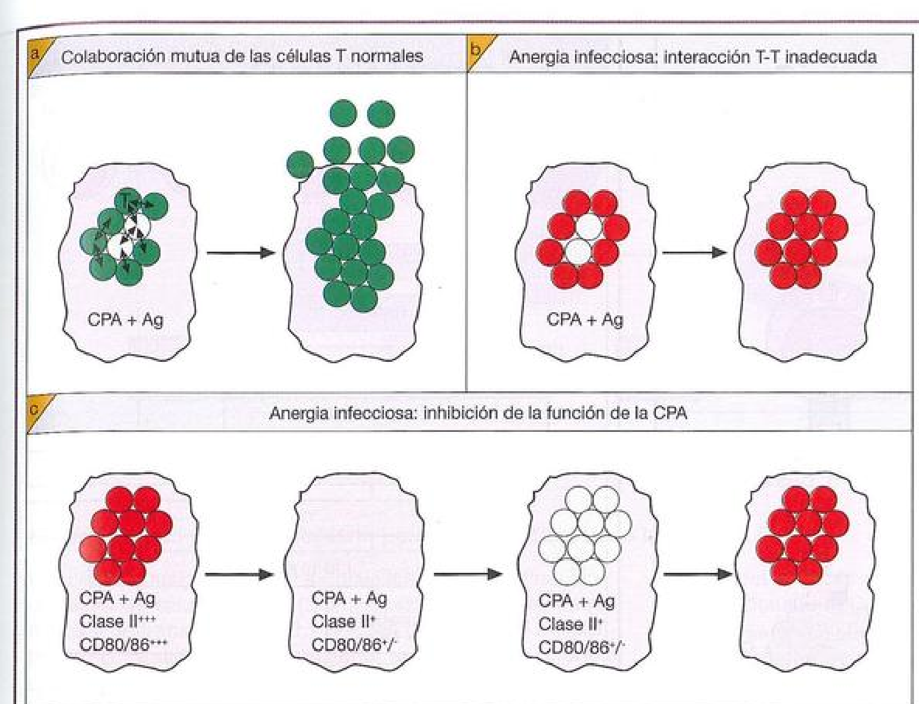


Figura 11.8. Anergia infecciosa.

a) Grupos de células T normales *(verde)* alrededor de células que adquirieron inmunocompetencia reciente *(gris)* y reaccionan con la misma CPA que mutuamente favorece la activación y la proliferación. b) Las células con inmunocompetencia reciente rodeadas por células T anérgicas *(rojo)* no reciben señales estimuladoras de las células vecinas y se tornan anérgicas por sí mismas. c) Las células T anérgicas pueden actuar como células que regulan negativamente la expresión de las moléculas de clase II del CMH, CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2) en la CPA. Este efecto requiere el contacto intercelular entre las células T anérgicas y la CPA. El encuentro posterior de células recientemente inmunocompetentes con esta CPA conducirá a la anergia.

necesarias interacciones paracrinas o multicelulares entre respondedores posibles unidos a una única CPA para dirigir las células a la división (Figura 11.8a). Se apreciará que si una célula T virgen se une a su antígeno, incluso sobre una CPA profesional en los tejidos linfoides secundarios, ésta no será estimulada si sus vecinas en el grupo ya se han convertido en anérgicas. En realidad, en lugar de ser activada, se convertirá en anérgica, lo que perpetúa el proceso de anergia infecciosa (Figura 11.8b). Las células Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, que a menudo exhiben de modo natural un estado de anergia profunda, pueden ser las células fundamentales aquí. Se considera que estas células pueden inhibir las moléculas de clase II del CMH y las coestimuladoras CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2) en las CPA, lo que genera una anergia infecciosa que no necesita la presencia simultánea de las células Treg y de aquellas que por sí mismas se convertirán en anérgicas (Figura 11.8c). Las células T reguladoras anérgicas podrían también ser capaces de inducir la apoptosis en las células dendríticas por medio de interacciones CD95-CD95L o hacer que las células dendríticas induzcan la apoptosis en las células T respondedoras, de nuevo por la vía del CD95. Más adelante, en el Capítulo 16, veremos que la inducción de la inmunosupresión en el trasplante con un anti-CD4 que no produzca depleción puede ser de duración prolongada debido a que la producción de células T reguladoras anérgicas impiden la sensibilización (cebado) de los linfocitos T inmunocompetentes recientes por el antígeno o los antígenos del trasplante.

La falta de comunicación puede producir incapacidad de respuesta

Hacen falta dos para bailar el tango: si la molécula propia no puede ocupar el TCR, no puede haber ninguna respuesta. El aislamiento anatómico de las moléculas, a semejanza de la proteína del cristalino del ojo y la proteína básica de la mielina en el cerebro, prácticamente impide que estas proteínas se pongan en contacto con los linfocitos, excepto quizá para cantidades mínimas de productos metabólicos de degradación que se filtran y pueden ser captados por las células presentadoras de antígenos, pero en concentraciones muy por debajo de las necesarias para activar la correspondiente célula T virgen (no estimulada).

Aun cuando un tejido quede expuesto a los linfocitos circulantes, la concentración del péptido procesado en la superficie celular puede ser insuficiente para llamar la atención de una célula potencialmente autorreactiva en ausencia de la molécula coestimuladora B7. Esto se demostró de un modo elegante en animales que tienen dos transgenes: uno para el TCR de una célula T citotóxica CD8 específica para la glucoproteína del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCM) y el otro para la glucoproteína en sí expresada en las células β pancreáticas a través del promotor de insulina. ¿El resultado? Un silencio ensordecedor: las células T no sufrieron deleción ni fueron tolerantes, y las células β no fueron atacadas. Si estos ratones luego se infectaban con el virus LCM, las células T transgénicas vírgenes se presentaban con concentraciones adecuadas de glucoproteínas procesadas dentro del contexto adyuvante de una verdadera infección y entonces eran estimuladas. Su progenie *cebada*, con una avidez mayor y que en consecuencia era capaz de reconocer bajas concentraciones de glucoproteínas procesadas en las células β, atacó su diana incluso en ausencia de B7 y causó diabetes (Figura 11.9). Esto puede parecer una nimiedad, pero el principio podría tener implicancias importantes en la inducción de autoinmunidad por reacción cruzada con los epítopos de las células T.

Las moléculas que están específicamente restringidas a órganos particulares que por lo común no expresan molécu-

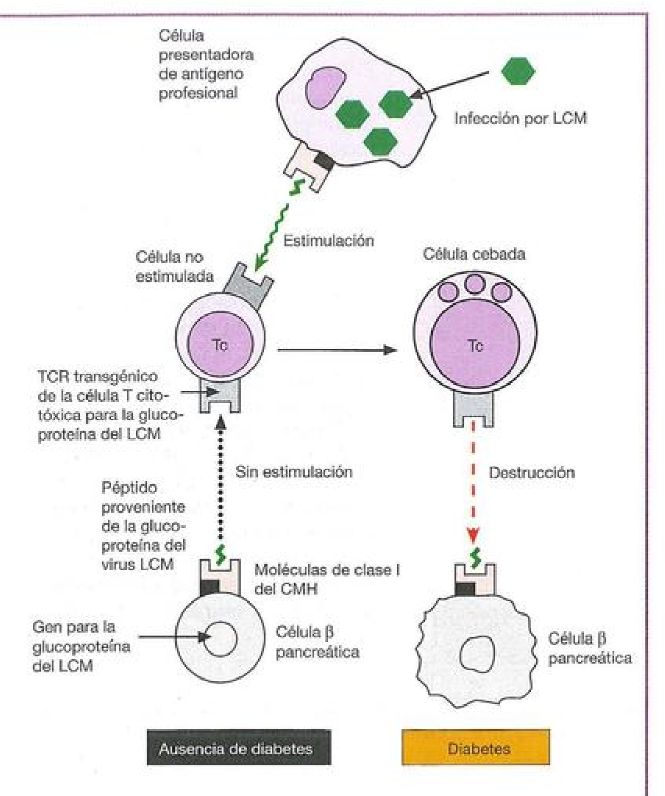


Figura 11.9. Falta de percepción mutua de un precursor de la célula T citotóxica virgen y su diana celular B7 negativo que porta epítopos en bajas concentraciones.

Cebado de las células vírgenes por una infección natural y el ataque posterior por células estimuladas con mayor avidez sobre el tejido diana. LCM, virus de la coriomeningitis linfocítica. (De Ohashi y col. [1991] *Cell* **65**, 305-317.)

las de clase II del CMH representan otro caso especial, ya que no tendrían la oportunidad de interactuar con células T *helper* CD4 específicas de órganos.

También se produciría el silencio inmunitario si un individuo carece de genes que codifiquen los receptores del linfocito dirigidos contra determinantes propios particulares. El análisis experimental de la respuesta inducida de autoanticuerpos contra el citocromo *c* sugiere que sólo aquellas partes de la molécula que muestran variación de especie son autoantigénicas, mientras que las regiones altamente conservadas en las que los genes no han sido alterados durante un tiempo mucho más prolongado parecen ser silenciosas, supuestamente debido a que las especificidades autorreactivas han tenido tiempo de desaparecer durante la evolución.

Las células B se diferencian en el hígado fetal y después en la médula ósea

Varios de los marcadores de diferenciación se asocian con la maduración de la célula B (Figura 11.10). Los precursores de los linfocitos B, las células pro-B, están presentes entre los islotes de las células hematopoyéticas en el hígado fetal alrededor de las 8-9 semanas de gestación en los seres humanos y a los

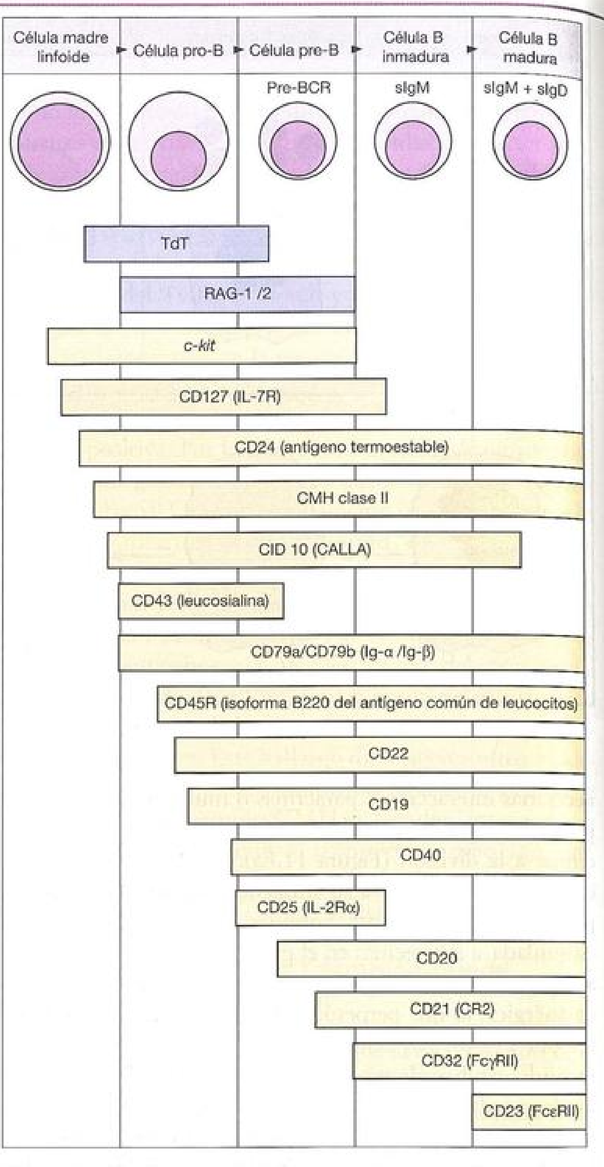


Figura 11.10. Algunos de los marcadores de diferenciación de las células B en desarrollo.

Se observa el momento de aparición de las enzimas que participan en el reordenamiento y la diversificación del gen de Ig *(recuadros azules)* y de los marcadores de superficie definidos por anticuerpos monoclonales (*recuadros anaranjados*; véase el Cuadro 11.1 para el listado de los miembros de CD).

14 días en el ratón. La producción de células B declina en el recién nacido y el hígado neonatal, y en su mayor parte es asumida por la médula ósea durante el resto de la vida. Las células reticulares de la estroma, que expresan las moléculas de adhesión y secretan IL-7, extienden largas prolongaciones dendríticas que establecen un contacto íntimo con los progenitores de las células B provistas de receptores positivos para IL-7.

Pax5 es un factor determinante fundamental en la diferenciación de las células B

El desarrollo de las células hematopoyéticas a lo largo del linaje de las células B requiere la expresión de E2A y del fac-

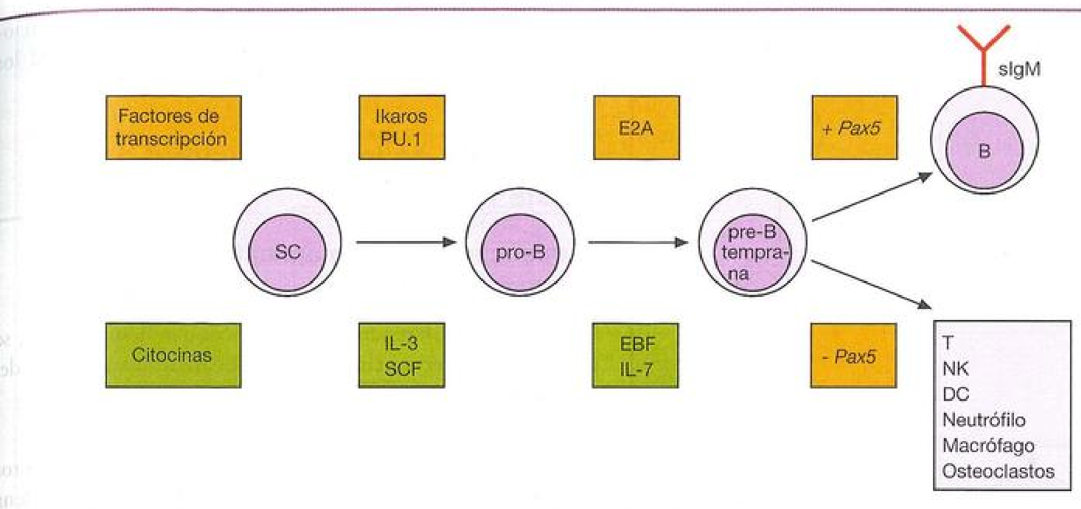


Figura 11.11. El *Pax5* es necesario para la diferenciación de las células B.

Las células madre (SC) hematopoyéticas bajo la influencia del factor de células madre (SCF), de IL-3 y de los factores Ikaros y de transcripción PU.1 pueden diferenciarse en células pro-B. La diferenciación posterior en células pre-B requiere el factor de transcripción E2A junto con el factor de células B temprano (EBF) e IL-7. Los ratones mutantes E2A homocigotos carecen de células pre-B, como consecuencia de un bloqueo en el reordenamiento D_HJ_H en el locus de la cadena pesada de Ig más una reducción intensa de RAG-1, Ig-α, CD19 y transcritos λ_5. Si en el estadio pre-B temprano no se expresa *Pax5*, se produce la detención abrupta en la diferenciación del linaje de células B. Estas células pre-B tempranas han reordenado Ig D_H a J_H, lo cual indica su intención de convertirse en células B. Sin embargo, incluso en esta fase tardía puede haber otras opciones del linaje como se evidencia por el hecho de que, en ausencia de la expresión *Pax5*, pueden dar lugar a otros tipos celulares si se les proporciona las citocinas apropiadas. En efecto, los clones *Pax5*$^{-/-}$ son capaces de evolucionar a células T si se transfieren a ratones inmunodeficientes, caso en el cual expresan genes TCR reordenados además de su reordenamiento del gen de la cadena pesada Ig inicial.

tor de células B tempranas (*early B-cell factor*, EBF); la ausencia de cualquiera de éstos impide que las células pro-B progresen al estadio de célula pre-B (Figura 11.11). También es necesaria la expresión del gen *Pax5* que codifica el factor de transcripción BSAP (*B-cell-specific activator protein*; proteína activadora específica de células B). Así, en los ratones con desactivación génica *Pax5*$^{-/-}$, las células B tempranas (que contienen genes de la cadena pesada de inmunoglobulina parcialmente reordenados) no se diferencian en células B maduras con Ig$^+$ de superficie (Figura 11.11). ¡Sin embargo, si a las células pre-B provenientes de ratones con desactivación génica *Pax5*$^{-/-}$ se les proporciona citocinas apropiadas *in vitro*, pueden ser dirigidas a producir células T, células NK, macrófagos, células dendríticas, granulocitos e incluso osteoclastos! Estos hallazgos inesperados demuestran con claridad que las células pre-B tempranas pueden ser desviadas de su camino escogido y en cambio proporcionan una fuente de células para muchos otros linajes hematopoyéticos. Sin embargo, estas células B no son pluripotentes ya que, a diferencia de las células madre de la médula ósea, carecen de la capacidad de recuperar a los ratones que recibieron irradiación letal. Está claro que *Pax5* actúa como un gen crítico al dirigir el desarrollo de la célula B a lo largo de la vía correcta, y esto lo hace reprimiendo la expresión de genes como los que codifican Notch-1, mieloperoxidasa y el receptor para el factor estimulante de colonias de monocitos y macrófagos que están asociados con otros linajes, al tiempo que activa genes específicos de células B, como Ig-α, CD19 y la proteína adaptadora BLNK.

Las células B-1 y B-2 representan dos poblaciones distintas

Existe una subpoblación de células B (denominadas **células B-1**) que, además de la IgM de superficie, expresan CD5. Los precursores de esta subpoblación se trasladan desde el hígado fetal hasta la cavidad peritoneal bastante tempranamente en la vida; en este estadio representan el tipo de células B más abundante y predominan en su contribución a la red del idiotipo y a la producción de autoanticuerpos IgM multiespecíficos de baja afinidad, como también a los denominados anticuerpos "naturales" contra hidratos de carbono bacterianos, que al parecer se originan poco después en el período neonatal sin la exposición evidente a los antígenos convencionales.

El **fenotipo B-1, o sea, con elevada cantidad de IgM de superficie, baja cantidad de IgD de superficie, CD43$^+$ y CD23$^-$**, es compartido por una subpoblación minoritaria que, no obstante, es CD5$^-$; estas dos poblaciones se denominan B-1a y B1-b, respectivamente (Figura 11.12). El **fenotipo** de las **células B-2** convencionales, con **baja cantidad de IgM de superficie, alta cantidad de IgD de superficie, CD5$^-$, CD43$^-$ y CD23$^+$**, refleja que aquéllas representan un linaje de desarrollo separado. Pueden realizarse algunos comentarios generales. Al menos en los ratones, las células B-1a, B1-b y B-2 provienen de precursores separados. Si bien las células B-1 pueden cambiar al fenotipo B-2 y tal vez ocurra lo inverso, en circunstancias normales existe una mínima conversión entre los dos linajes. Las células B-1 son particularmente predominantes en las cavi-

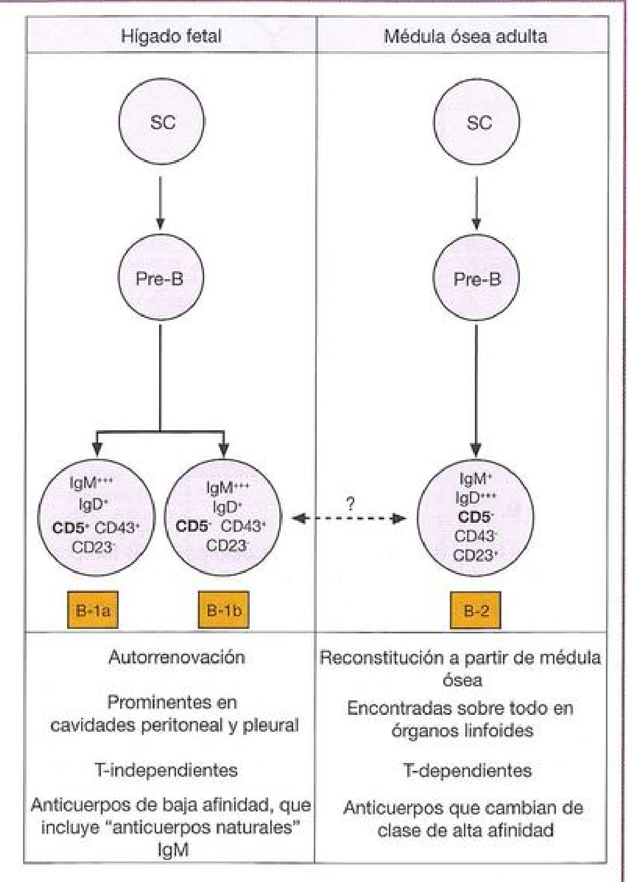


Figura 11.12. Desarrollo de subpoblaciones separadas de células B.

Las células B-1 en particular producen el "anticuerpo natural" IgM de menor afinidad. Por el contrario, las células B-2 dan origen al anticuerpo IgG de mayor afinidad producido por las células B que cambian de clase por las células T *helper*. Se considera que, aunque en ciertas circunstancias estas subpoblaciones podrían dar origen al otro tipo celular, en general se mantienen como linajes separados.

dades peritoneal y pleural, mantienen su número por autoperpetuación y limitan su producción de *novo* a partir de los progenitores mediante un mecanismo de regulación por retroalimentación. Pueden expresar en su superficie tanto CD5 como su ligando CD72, lo cual debería estimular una interacción mutua, si bien un factor fundamental que influye en la autorrenovación podría ser la producción constitutiva de IL-10, ya que el tratamiento de ratones con anti IL-10 desde el nacimiento elimina casi por completo la subpoblación B-1. La predisposición a la autorrenovación puede ser la causa subyacente de su susceptibilidad indebida a transformarse en células leucémicas; las células malignas en la leucemia linfocítica crónica son casi invariablemente CD5+.

Las células B-1 tienden a utilizar genes *V* particulares de la línea germinal y responden a los antígenos timoindependientes de tipo 2. Además, pueden estar implicadas en la generación de una red idiotípica en la autotolerancia, en la respuesta contra antígenos microbianos conservados y tal vez en la regulación idiotípica de las respuestas B-2. Por cierto, son la fuente de "anticuerpos naturales" que proporcionan una línea de defensa preexistente de IgM contra los microorganismos comunes.

Desarrollo de la especificidad de la célula B

Secuencia de reordenamientos del gen de inmunoglobulina

Durante la diferenciación de las células B tempranas, se produce una secuencia ordenada de reordenamientos del gen de Ig (Figura 11.13).

- **Etapa 1.** En un comienzo, se reordenan los segmentos *D-J* de ambos alelos de los locus del gen de la cadena pesada de Ig (uno de cada progenitor) de modo que el segmento *D* se ubica próximo a un segmento *J*. La naturaleza aleatoria de este proceso de reordenamiento en general produce la combinación de *DJ* de un alelo que es diferente a la del otro alelo.
- **Etapa 2.** El proceso de recombinación *AV-DJ* tiene lugar ahora sólo en uno de los dos alelos de la cadena pesada, mediante el cual un segmento *V* escogido al azar se coloca junto al segmento *DJ* ya recombinado. Si esto demuestra ser un reordenamiento *improductivo* (es decir, los segmentos adyacentes se unen en un marco de lectura incorrecto o de un modo tal que generan un codón de terminación en dirección 3′ a partir del punto de empalme), tiene lugar un segundo reordenamiento *V-DJ* sobre el locus de la cadena pesada hermana. Si no se logra el reordenamiento productivo, podemos muy bien despedirnos de la célula pre-B.
- **Etapa 3.** Si se realiza un reordenamiento productivo, el segmento *VDJ* en la célula pre-B utiliza el gen *Cμ* de la región constante de la cadena pesada (C_H) para sintetizar las cadenas pesadas *μ*. Más o menos al mismo tiempo, dos genes V_{preB} *(CD179a)* y λ_5 *(CD179b)*, con homología para los segmentos V_L y C_L de las cadenas ligeras λ, respectivamente, son transcritos de modo temporario para formar una "pseudocadena ligera", que se asocia con las cadenas μ para generar un receptor sustituto "IgM" de superficie, junto con las cadenas Ig-α(CD79a) e Ig-β(CD79b) requeridas convencionalmente para formar un receptor de células B funcional. Este receptor sustituto sigue un paralelismo estrecho con el receptor pre-Tα/β sobre los precursores de la célula pre-T que poseen TCR-αβ.
- **Etapa 4.** El receptor de superficie recibe una señal después del entrecruzamiento posiblemente por las cargas positivas de un segmento λ_5 con gran cantidad de arginina que interactúan con las regiones con cargas negativas de ligandos no definidos sobre las células estromáticas. La señalización por el receptor de la célula pre-B a través de Ig-α/β causa **exclusión alélica**, por la cual hay supresión de cualquier reordenamiento posterior de los genes de la cadena pesada en una cromátide hermana.
- **Etapa 5.** La expresión de los factores reguladores del interferón IRF-4 e IRF-8 da lugar a la inhibición de la producción de $V_{pre\text{-}B}$ y λ_5 e induce el reordenamiento de

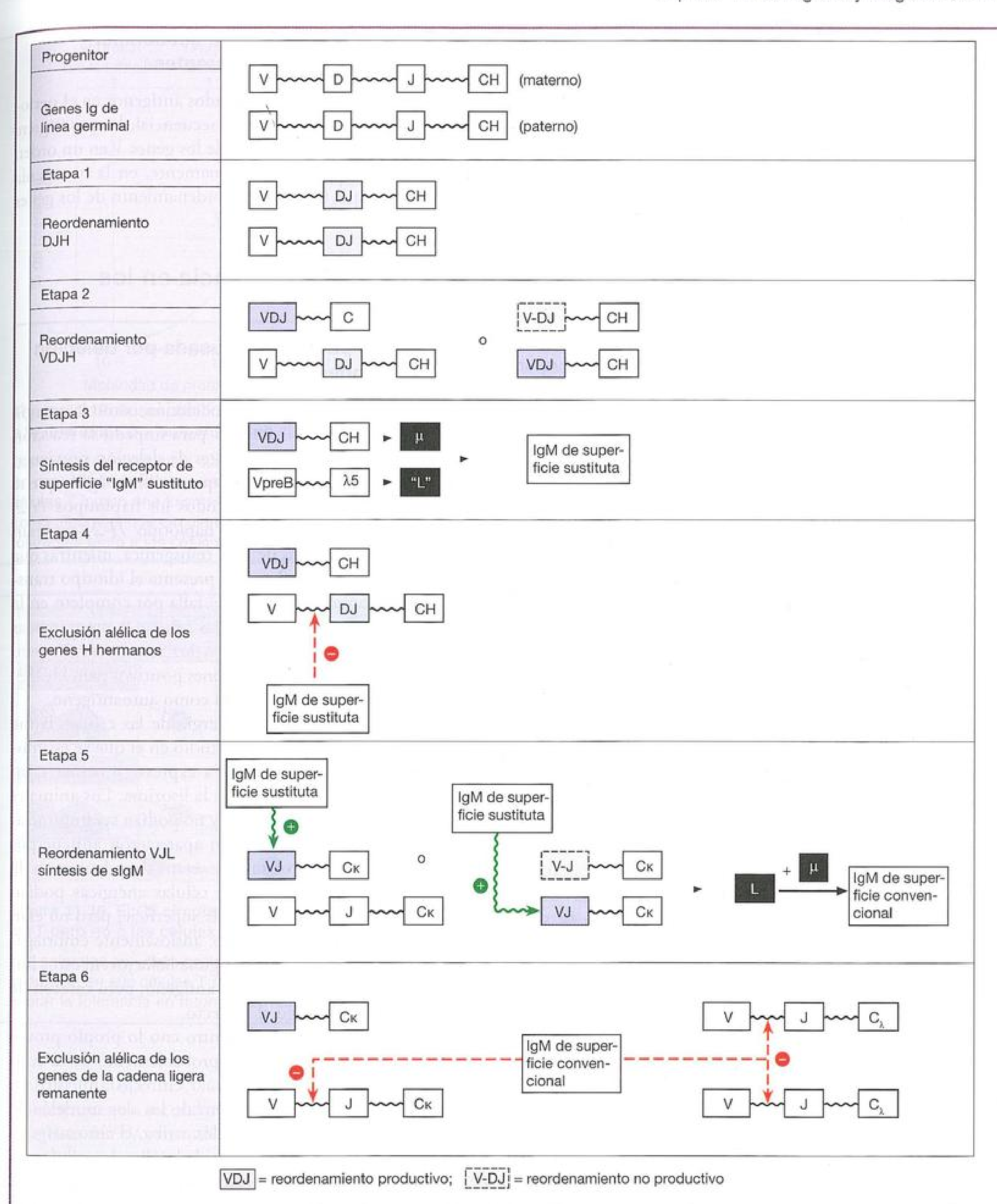


Figura 11.13. Secuencia de los reordenamientos génicos de las células B y mecanismos propuestos de exclusión alélica (véase el texto).

los genes convencionales de la cadena ligera. Esto implica las recombinaciones *V-J*, primero sobre uno y luego sobre el otro alelo κ hasta que se obtiene un reordenamiento productivo *V*κ*-J*. Si esto fallara, se intentaría el reordenamiento productivo de los alelos λ. Se considera que la expresión ulterior de una cadena ligera reordenada productivamente involucra la unión de los factores de transcripción IRF-4, IRF-8 y E-2A a los potenciadores κ o λ. Ahora se procede a la síntesis de la IgM de superficie convencional.

■ **Etapa 6.** La molécula IgM de superficie impide que se produzca una nueva recombinación de genes homólogos

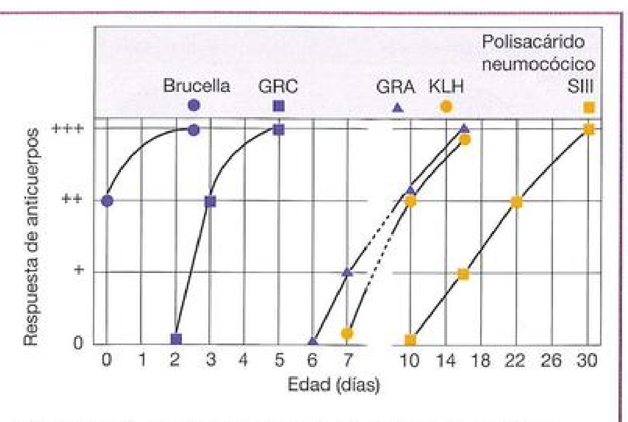


Figura 11.14. Aparición secuencial de la capacidad de respuesta contra diferentes antígenos en la rata neonatal.

GRC, eritrocitos de carnero; GRA, eritrocitos de asno; KLH, hemocianina de lapa.

(*gene shuffling*; barajado génico) mediante la exclusión alélica de todos los genes no reordenados de la cadena ligera. La IgD de superficie que posee una secuencia VDJ idéntica a la cadena pesada de la IgM es producida mediante corte y empalme alternativo del transcrito de RNA de la cadena pesada, y la célula B IgM+IgD+ virgen está ahora lista para su encuentro con el antígeno.

Tras la estimulación antigénica, se pierde la IgD, y en presencia de la célula T adecuada, puede producirse el cambio de clase en la producción de anticuerpo, de IgM a IgG, IgA o IgE. En los estadios terminales en la vida de un plasmocito totalmente maduro, se desprenden casi todas las Ig de superficie.

Importancia de la exclusión alélica

Como cada célula tiene cromosomas derivados de cada progenitor, la célula B en vías de diferenciación posee cuatro grupos de genes de cadena ligera (dos kappa y dos lambda) y dos de cadena pesada para escoger a partir de ellos. Ya hemos descrito cómo, una vez que sucede el reordenamiento *VDJ* del DNA dentro de un agrupamiento de la cadena pesada y un reordenamiento *VJ* en el de la cadena ligera, los genes *V* de los otros cuatro cromosomas se mantienen en el estado de línea germinal (es decir, heredado) por un mecanismo de exclusión alélica, de modo que la célula pueda expresar sólo una cadena ligera y una cadena pesada. Esto es esencial para que actúe la selección clonal, ya que la célula es entonces programada para elaborar únicamente el anticuerpo que utiliza como receptor de la superficie celular en el reconocimiento del antígeno. Además, este mecanismo de exclusión génica impide la formación de moléculas que contengan dos cadenas ligeras o dos cadenas pesadas diferentes que podrían tener sitios de unión no idénticos y, en consecuencia, serían monovalentes desde el punto de vista funcional con respecto a la mayoría de los antígenos; estos anticuerpos serían no aglutinantes y tenderían a tener baja avidez porque no podría operar el efecto de bonificación de la multivalencia.

Pueden aparecer de manera secuencial respuestas específicas diferentes

Las respuestas contra determinados antígenos en el período neonatal aparecen de manera secuencial, lo que sugiere un reordenamiento programado de los genes *V* en un orden definido (Figura 11.14). Tempranamente, en la ontogenia existe un sesgo que favorece el reordenamiento de los genes V_H más próximos al segmento *DJ*.

Inducción de la tolerancia en los linfocitos B

La tolerancia puede ser causada por deleción clonal y por anergia clonal

Como en las células T, tanto la deleción como la anergia pueden participar en las células B para impedir la reacción contra lo propio. Pruebas excelentes de deleción provienen de ratones que portan transgenes que codifican IgM, que se unen a las moléculas H-2K de todos los haplotipos *H-2*, excepto *d* y *f*. Los ratones con haplotipo $H\text{-}2^d$ expresan grandes cantidades séricas de IgM transgénica, mientras que el 25-50% de las células B totales presenta el idiotipo transgénico. El cruzamiento F1 ($d \times k$) falla por completo en la expresión del transgén, es decir, las células B programadas para anti-H-$2K^k$ se expresaban en los ratones $H\text{-}2^d$, pero habían sufrido deleción en los ratones positivos para H-$2K^k$, que en estas circunstancias actúan como autoantígeno.

La tolerancia a través de la anergia de las células B fue demostrada claramente en otro estudio en el que se estimuló a ratones transgénicos dobles a expresar lisozima y un anticuerpo de alta afinidad contra la lisozima. Los animales fueron completamente tolerantes y no podían ser inmunizados para elaborar antilisozima, ni aparecieron anticuerpos transgénicos en el suero aunque eran abundantes en la superficie de las células B. Estas células anérgicas podían unir el antígeno a sus receptores de superficie, pero no eran activadas. Como el viejo libertino, ansiosamente embriagado por los atractivos visuales de alguna bella joven, estos linfocitos tolerantes pueden "ver" el antígeno, pero carecen de la capacidad de hacer algo al respecto.

La posibilidad de que el encuentro con lo propio provoque deleción o anergia depende probablemente de la concentración y la capacidad de formar entrecruzamientos en los receptores de Ig. En el primero de los dos modelos de tolerancia de células B mencionados arriba, el autoantígeno H-$2K^k$ se expresaría en gran cantidad sobre las células en contacto con los linfocitos B en desarrollo y podría causar entrecruzamientos efectivos. En el segundo caso, la lisozima, enmascarada como molécula "propia", es en esencia univalente con respecto a los receptores de una célula B antilisozima y no establecería con facilidad entrecruzamientos. La hipótesis fue probada mediante el agregado de un segmento hidrófobo transmembrana en el transgén de la lisozima de modo que el antígeno se insertara en la membrana celular. ¿El resultado? Las células B que expresan el transgén antilisozima de alta afinidad fueron eliminadas.

Puede entrar en juego otro mecanismo de autocensura, denominado corrección (edición) del receptor. Ya hemos

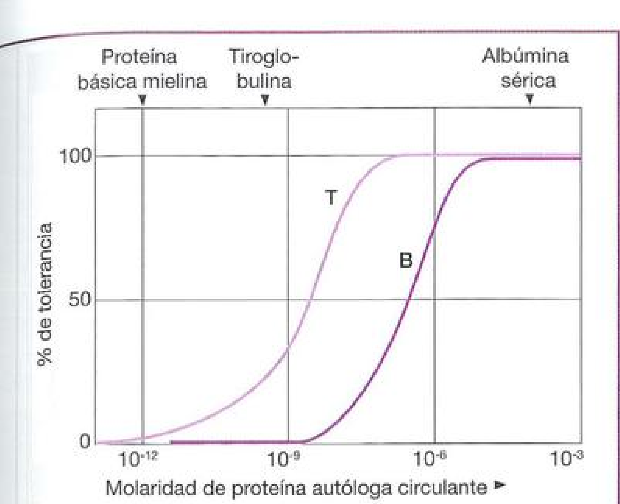


Figura 11.15. Susceptibilidad relativa de las células T y B a la tolerancia por autoantígenos circulantes.

Los que circulan en baja concentración no inducen tolerancia; en concentración intermedia, por ejemplo tiroglobulina, las células T logran una tolerancia moderada, y las moléculas como albúmina que circulan en altas concentraciones tornan tolerantes tanto a las células B como a las células T.

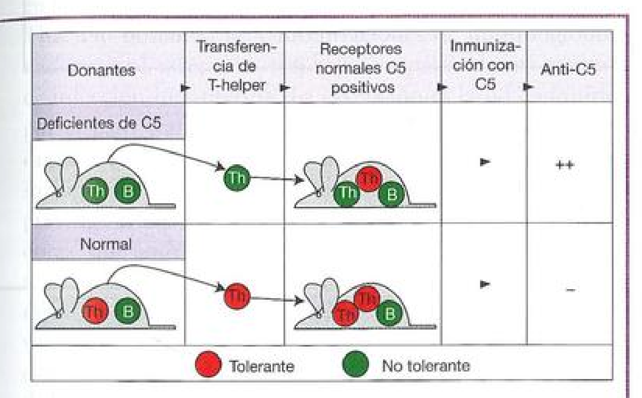


Figura 11.16. El C5 circulante torna tolerantes a las células T pero no a las células B, carentes de cooperación.

Los animales con deficiencia congénita de C5 no inducen tolerancia en sus células T *helper* y pueden ser utilizadas para alterar la tolerancia en ratones normales.

analizado un tipo de corrección del receptor en el cual los reordenamientos secundarios sustituyen a otro gen *V* en un segmento *V(D)J* ya reordenado. Sin embargo, la corrección del receptor también puede producirse por el remplazo en bloque de toda una cadena ligera. Esto se explica mejor mediante un ejemplo. Si los genes de la cadena ligera y pesada de la Ig que codifican un autoanticuerpo anti-DNA de alta afinidad se introducen como transgenes en un ratón, se produce una variedad de cadenas ligeras por una nueva recombinación génica (*reshuffling*) hasta que se logra una combinación con la cadena pesada que ya no tiene actividad anti-DNA, es decir que se ha corregido la autorreactividad. A menudo, esto implica el remplazo de una cadena ligera κ con un reordenamiento nuevo realizado en el locus de la cadena ligera λ y se asocia con la reexpresión de los genes *RAG-1/2*.

Una vez que la mayor parte de la dotación de células B alcanza la periferia, es estable. Las células B (y T) de los ganglios linfáticos provenientes de ratones no expuestos al antígeno sobrevivieron de manera confortable durante al menos 20 meses al transferirlos a animales con IDCG con H-2 idénticos.

La tolerancia puede ser el resultado de células B "desvalidas"

Al menos con las proteínas solubles, las células T son más fácilmente tolerantes que las células B (Figura 11.15), y de acuerdo con la concentración de proteína circulante, puede haber en el organismo ciertas células B autorreactivas que no pueden ser activadas por componentes propios dependientes de T, puesto que las células T requeridas para proporcionar la cooperación necesaria T-B son ya tolerantes; se podría describir a las células B como "desvalidas" (*helpless*, que carecieron de cooperación). Si consideramos como un hapteno al determinante de un componente propio que se combina con los receptores en una célula B autorreactiva y como un portador a otro determinante que tiene que ser reconocido por una célula T (véase la Figura 8.14), la tolerancia en la célula T para el portador evitará la provisión de células T *helper* y la célula B será incapaz de responder. Tomemos como ejemplo a C5; normalmente, éste circula en concentraciones que inducen la tolerancia de las células T, pero no de las células B. Algunas cepas murinas presentan una deficiencia congénita de C5, y sus células T pueden contribuir a que las cepas C5 positivas elaboren anticuerpos contra C5; es decir, las cepas C5 positivas tienen células B inducibles pero están desvalidas y necesitan células T no tolerantes provenientes de la cepa C5 negativa (Figura 11.16).

Vale la pena destacar que la inyección de dosis elevadas de un antígeno soluble sin adyuvante, incluso cuando se administra varios días después de la inmunización primaria con ese antígeno, impide la aparición de anticuerpos mutados de alta afinidad. Los experimentos de transferencia demostraron que las células T eran tolerantes. Esto indica que, aun cuando una respuesta está bien encaminada, se necesitan células T *helper* en los centros germinativos para permitir las mutaciones que conducen a la maduración de la afinidad de los anticuerpos y, como corolario adicional, que los autoantígenos solubles en los líquidos extracelulares pueden actuar para inactivar las células B autorreactivas que se originan por hipermutación en los centros germinativos.

Es presumible que la autotolerancia tanto en las células B como en las células T involucre en grados variables todos los mecanismos que fueron descritos y que se resumen en la Figura 11.17. Es importante recordar que, durante la vida de un animal, las nuevas células madre sufren un proceso de diferenciación continuo para formar linfocitos inmunocompetentes, y lo que es temprano en la ontogenia para ellos puede ser tardío para el huésped; esto significa que los mecanismos de autotolerancia son aún activos en los linfocitos prematuros incluso en el adulto, aunque siempre reconforta destacar que la concentración umbral para la inducción de la tolerancia es mucho más baja para las células pre-B que para las células B maduras.

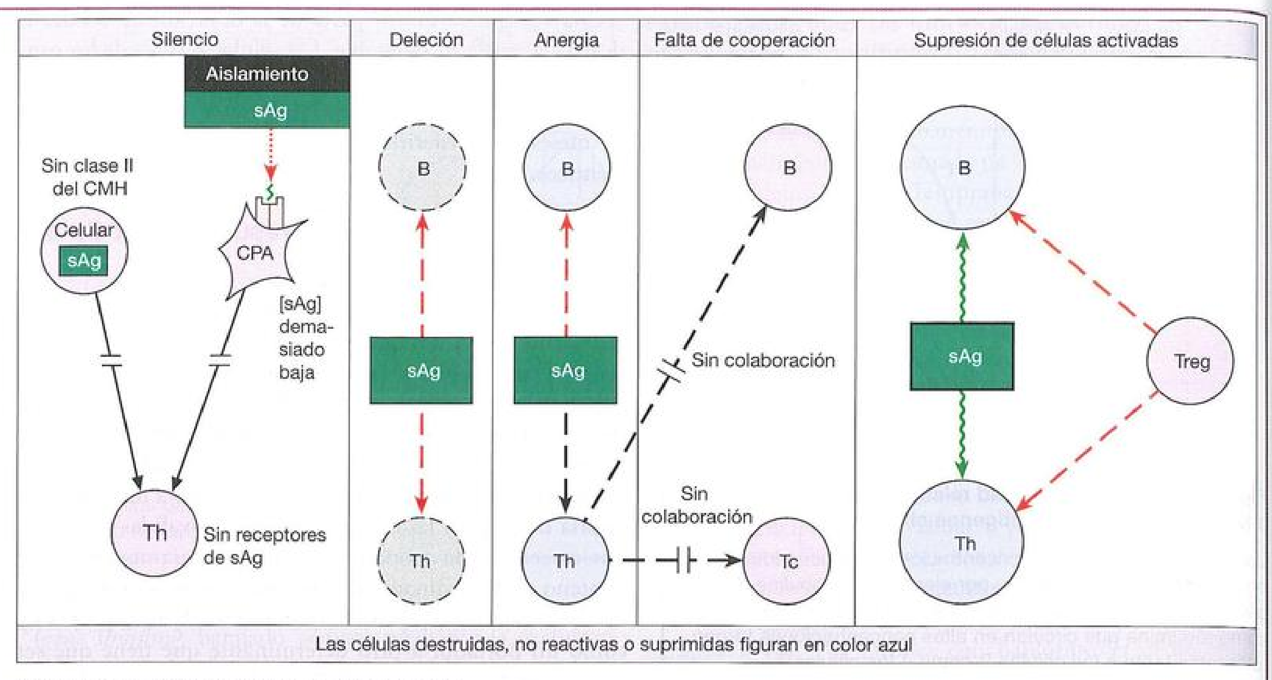


Figura 11.17. Mecanismos de autotolerancia.

(Véase el texto). sAg, autoantígeno; CPA, célula presentadora de antígeno; Th, T *helper*, Treg, T reguladora; Tc, precursora de célula T citotóxica.

Ontogenia de las células *natural killer* (NK)

Las células *natural killer* se diferencian sobre todo en la médula ósea a partir de células madre hematopoyéticas, aunque algunas células NK pueden originarse en el timo a partir de precursores linfoides tempranos. Estas células madre hematopoyéticas y los precursores linfoides tempranos dan origen a precursores NK que pueden permanecer en los órganos linfoides primarios o sembrar los ganglios linfáticos, el bazo y el hígado. Los precursores son estimulados para proliferar y diferenciarse por la IL-2 y la IL-15. En este estadio, ellos carecen de muchos de los marcadores de las células NK maduras como CD16 (FcγRIII) y los receptores NK inhibidores y estimuladores. Tras la expresión de los receptores inhibidores y su ocupación ulterior por moléculas propias del CMH, sucede un proceso conocido como "instrucción" o "licenciamiento" de las células NK, que es fundamental para su desarrollo en células NK maduras completamente funcionales. Las células NK maduras pueden entonces trasladarse a otras localizaciones en el organismo, que incluyen los tejidos de las mucosas, como aparato respiratorio, tubo digestivo y útero.

Respuesta global en el neonato

En el momento de nacer, los ganglios linfáticos y el bazo en los seres humanos están relativamente subdesarrollados, excepto cuando se ha producido la exposición intrauterina a antígenos como en las infecciones congénitas por el virus de la rubéola u otros microorganismos. Si bien la capacidad de rechazar injertos y montar una respuesta de anticuerpos está razonablemente bien desarrollada al nacer, el sistema inmunitario es todavía relativamente inmaduro y, por consiguiente, su competencia inmunitaria no es completa. En general,

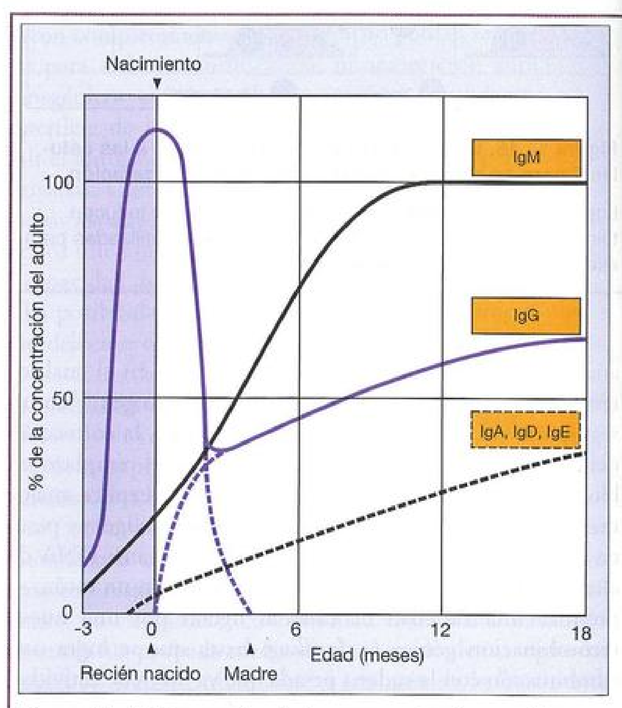


Figura 11.18. Desarrollo de las concentraciones séricas de inmunoglobulina en los seres humanos.

(De Hobbs J.R. [1969]. En Adinolfi M. [ed.] *Immunology and Development*, p. 118. Heinemann, London.)

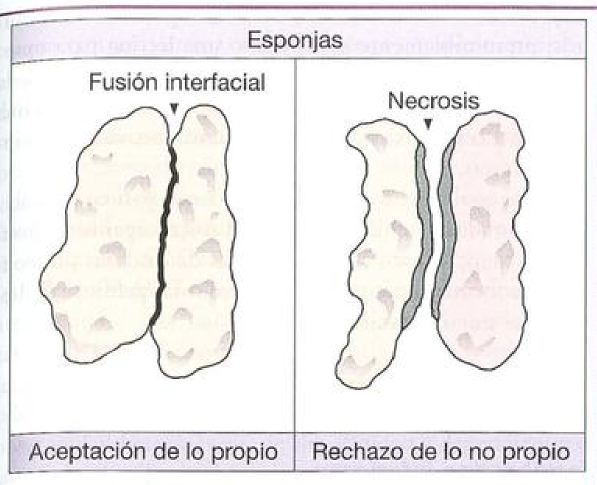


Figura 11.19. Reconocimiento y rechazo de lo no propio. Los dedos parabiosados de la esponja de mar provenientes de la misma colonia se unen de manera permanente, pero los miembros de colonias diferentes se rechazan entre sí alrededor de los 7-9 días.

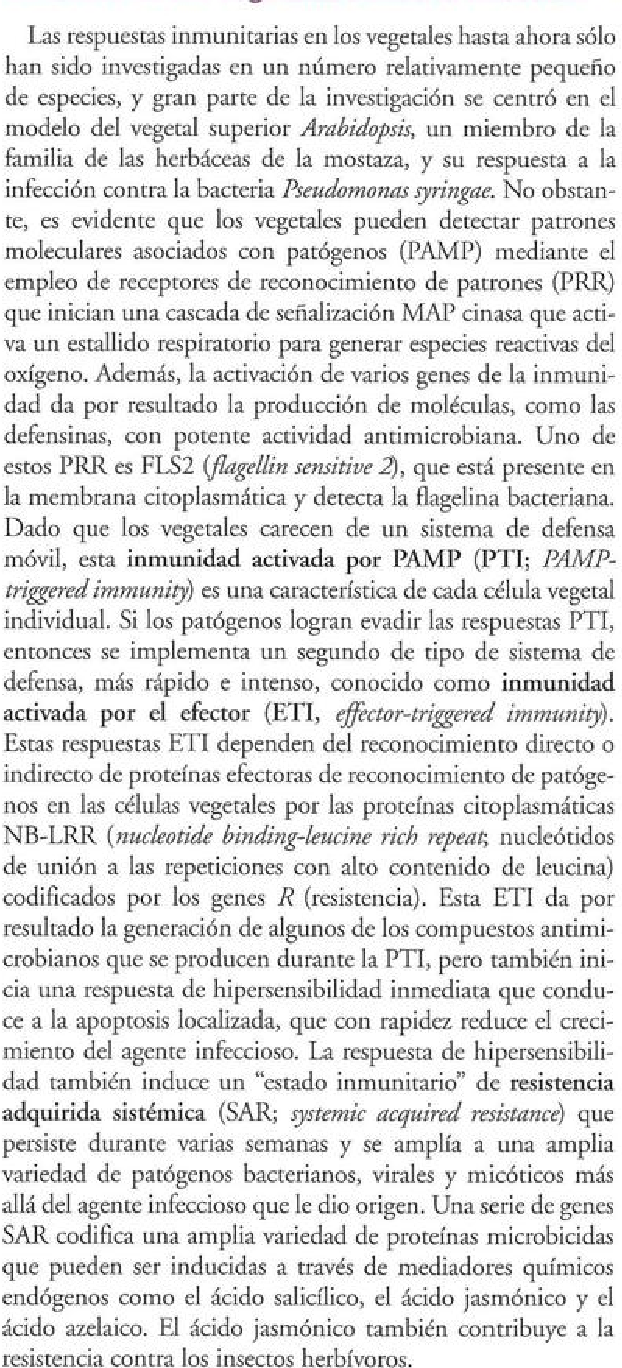
en los recién nacidos hay una desviación hacia las respuestas Th2. No obstante, las concentraciones de inmunoglobulinas, con una excepción, son bajas, en particular en ausencia de infección intrauterina. La excepción es la IgG adquirida por el paso transplacentario a partir de la madre, proceso que utiliza el receptor Fc neonatal, FcRn (véase la Figura 3.17a). La combinación de la inmadurez inmunitaria y la presencia de anticuerpos maternos posiblemente "bloqueadores" que podrían limitar el acceso del antígeno a los receptores de las células B podrían afectar la generación de memoria inmunitaria contra las infecciones naturales y las vacunas en el recién nacido. Sin embargo, la IgG materna es catabolizada con una semivida de alrededor de 3 a 4 semanas y existe una disminución en la concentración de IgG durante los primeros 3 meses, acentuada por el aumento de la volemia del lactante en etapa de crecimiento. En consecuencia, la tasa de síntesis de IgG por las células B propias del recién nacido supera la tasa de degradación de la IgG materna, y la concentración global aumenta de manera continua. Las otras inmunoglobulinas no atraviesan la placenta y las concentraciones bajas pero significativas de IgM en la sangre del cordón son sintetizadas por el recién nacido (Figura 11.18). La IgM alcanza las concentraciones del adulto alrededor de los 9 meses de edad. Sólo existen vestigios de IgA, IgD e IgE en la circulación del neonato.

Evolución de la respuesta inmunitaria

Defensas más primitivas

Prácticamente todos los organismos vivos cuentan con mecanismos que han evolucionado para protegerlos contra las infecciones. Las endonucleasas de restricción no surgen para facilitar la vida del genetista molecular; éstas ofrecen protección a los procariontes (bacterias y archaea) contra la infección con virus bacteriófago al cortar los DNA extraños. Las amebas son eucariontes unicelulares capaces de fagocitar y, con posterioridad, degradar las partículas por fagocitosis, un proceso que evolucionó en una estrategia de defensa de importancia en todo el reino animal (véase Avances y descubrimientos 1.1). Los mecanismos para el reconocimiento y posterior **rechazo de lo no propio** pueden identificarse en los invertebrados hasta los niveles más bajos de la escala evolutiva, como las esponjas marinas (Figura 11.19).





Defensas de los vegetales contra la infección

Las respuestas inmunitarias en los vegetales hasta ahora sólo han sido investigadas en un número relativamente pequeño de especies, y gran parte de la investigación se centró en el modelo del vegetal superior *Arabidopsis*, un miembro de la familia de las herbáceas de la mostaza, y su respuesta a la infección contra la bacteria *Pseudomonas syringae*. No obstante, es evidente que los vegetales pueden detectar patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP) mediante el empleo de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que inician una cascada de señalización MAP cinasa que activa un estallido respiratorio para generar especies reactivas del oxígeno. Además, la activación de varios genes de la inmunidad da por resultado la producción de moléculas, como las defensinas, con potente actividad antimicrobiana. Uno de estos PRR es FLS2 (*flagellin sensitive 2*), que está presente en la membrana citoplasmática y detecta la flagelina bacteriana. Dado que los vegetales carecen de un sistema de defensa móvil, esta **inmunidad activada por PAMP** (PTI; *PAMP-triggered immunity*) es una característica de cada célula vegetal individual. Si los patógenos logran evadir las respuestas PTI, entonces se implementa un segundo de tipo de sistema de defensa, más rápido e intenso, conocido como **inmunidad activada por el efector** (ETI, *effector-triggered immunity*). Estas respuestas ETI dependen del reconocimiento directo o indirecto de proteínas efectoras de reconocimiento de patógenos en las células vegetales por las proteínas citoplasmáticas NB-LRR (*nucleotide binding-leucine rich repeat*; nucleótidos de unión a las repeticiones con alto contenido de leucina) codificados por los genes *R* (resistencia). Esta ETI da por resultado la generación de algunos de los compuestos antimicrobianos que se producen durante la PTI, pero también inicia una respuesta de hipersensibilidad inmediata que conduce a la apoptosis localizada, que con rapidez reduce el crecimiento del agente infeccioso. La respuesta de hipersensibilidad también induce un "estado inmunitario" de **resistencia adquirida sistémica** (SAR; *systemic acquired resistance*) que persiste durante varias semanas y se amplía a una amplia variedad de patógenos bacterianos, virales y micóticos más allá del agente infeccioso que le dio origen. Una serie de genes SAR codifica una amplia variedad de proteínas microbicidas que pueden ser inducidas a través de mediadores químicos endógenos como el ácido salicílico, el ácido jasmónico y el ácido azelaico. El ácido jasmónico también contribuye a la resistencia contra los insectos herbívoros.

Mecanismos de defensa antimicrobiana en los invertebrados

En muchos tipos o filos, la fagocitosis se incrementa

mediante el recubrimiento con aglutininas y bactericidinas capaces de unirse a los PAMP sobre la superficie microbiana, de modo que proporciona la base para el reconocimiento de lo "no propio". Es notable que la infección induzca muy rápidamente la síntesis de una batería impresionante de péptidos antimicrobianos en los insectos más evolucionados, después de la activación de factores de transcripción que se unen a los motivos homólogos de la secuencia del promotor de los elementos reguladores involucrados en la respuesta de la fase aguda de los mamíferos. Así, la molécula *toll* en las drosófilas es un receptor para los PAMP que activan NFκB en estas moscas. *Drosophila* con una pérdida de la función de mutación en *toll* son susceptibles a las infecciones micóticas. Los péptidos antimicrobianos producidos por los insectos incluyen péptidos cíclicos con enlaces disulfuro, como las defensinas contra grampositivos y el péptido antimicótico, la drosomicina. Los péptidos lineales inducibles por la infección consisten en cecropinas y una serie de polipéptidos con alto contenido en glicina o prolina contra gramnegativos. Las cecropinas, que también se identificaron en mamíferos, son péptidos intensamente catiónicos con hélices α anfipáticas que causan desintegración letal de las membranas bacterianas mediante la creación de canales iónicos.

También se encuentran entre los órdenes más inferiores los elementos de un sistema del complemento primitivo. Un inhibidor de proteasa, una β_2-macroglobulina, homóloga desde el punto de vista estructural a C3 con tioléster interno, está presente en el cangrejo herradura. Es concebible que esto pueda representar una versión ancestral de C3 que es activado por las proteasas liberadas en un sitio de infección, depositado sobre el microorganismo y reconocido como un ligando para las células fagocíticas. El receptor para el complemento CR3 es una integrina, y las integrinas relacionadas en los insectos pueden albergar antepasados comunes. La mención del cangrejo herradura puede haber agitado una red neuronal en los lectores con buena memoria para recordar la síntesis de su limulina, que es homóloga a la proteína C reactiva (PCR) de la fase aguda de los mamíferos; presumiblemente actúa como una lectina para opsonizar las bacterias y es probable que sea un producto de la línea evolutiva que conduce por último al C1q, a la lectina de unión a la manosa y a la sustancia tensioactiva (surfactante) pulmonar.

La otra estrategia importante que despliegan con eficacia los vertebrados es el aislamiento del microorganismo invasor. Por ejemplo, esto se logra a través de cascadas proteolíticas que forman un coágulo de hemolinfa "gelificada" alrededor del microorganismo agresor.

Las respuestas inmunitarias adaptativas aparecen con los vertebrados

Vertebrados inferiores

Los vertebrados agnados (sin mandíbula), que en la actualidad comprende únicamente la lamprea y los mixinos, poseen células similares a los linfocitos que expresan un receptor A de linfocitos variable sólo transmembrana (VLRA, *variable lymphocyte receptor A*) en las células que pueden mediar respuestas celulares y un VLRB en las células que median respuestas humorales que también se produce como una molécula secretada. Estos VLR no son miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas, pero contienen regiones variables y constantes y usan un mecanismo similar a la conversión génica para generar diversidad. Las respuestas de linfocitos y de células T y B adaptativas genuinas no surgen en el árbol filogenético hasta llegar a los vertebrados con mandíbulas.

Aparecen las células T

Los peces cartilaginosos tienen células T y B bien definidas junto con inmunoglobulinas 18S y 7S con cadenas ligeras y pesadas, pero las respuestas son *independientes de la célula T.* El sapo, *Xenopus*, es una especie versátil, si bien poco agraciada, para el estudio ya que es posible obtener y

Figura 11.20. Efecto de la bursectomía y la timectomía neonatal en el desarrollo de la competencia inmunitaria en el pollo.

LSP, recuento de linfocitos de sangre periférica ×10 ³;Conc. Ig total, concentración de inmunoglobulinas circulantes; Rta de atc, respuesta de anticuerpos frente a la inmunización con antígeno específico; HR, hipersensibilidad retardada; IVH, reacción de injerto versus huésped. (De Cooper M.D., Peterson R.D.A., South M.A. y Good R.A. [1966] *Journal of Experimental Medicine* **123**, 75, con autorización de los editores.)

	Pollo intacto	Timectomía	Bursectomía
LSP	14,5	9.1	13,3
Conc. Ig total	+++	+++	-
Rta de atc	+++	+	-
HR	+++	-	+++
Rechazo de injerto	+++	+	++
IvsH	+++	+	+++

clonar renacuajos transgénicos con bastante facilidad, y cuenta con un sistema linfoide menos complejo que el de los mamíferos, caracterizado por un pequeño número de linfocitos y un repertorio de anticuerpos restringido no sujeto a mutación somática. Además, en los sapos se demostró la existencia de selección tímica positiva y negativa.

La aparición de un timo verdadero en los teleósteos (peces óseos), anfibios, reptiles, aves y mamíferos se asoció con las moléculas del CMH, la inmunidad mediada por células, las células T citotóxicas y el rechazo de aloinjertos. Podría argumentarse que también comprobamos la presencia de células B-1 (CD5 positivas), más antiguas filogenéticamente, unidas por una nueva población B-2 dependientes de las células T. Sin embargo, las respuestas secundarias de anticuerpos, rápidas, heterogéneas, de alta afinidad y dependientes de las células T sólo se observan en los vertebrados homeotermos, como las aves y los mamíferos, y se correlacionan directamente con la evolución de centros germinativos.

Generación de la diversidad de anticuerpos

Los mecanismos para la generación de la diversidad de anticuerpos reciben un énfasis bastante diferente según la especie considerada. Ya estamos familiarizados con el sistema de los mamíferos, en los que los procesos de recombinación incluyen los múltiples segmentos génicos *V*, *D* y *J*. El tiburón suño cornudo (*Heterodontus francisci*) también tiene muchos genes *V*, pero las oportunidades de uniones combinatorias están muy limitadas por el íntimo ligamiento entre los segmentos individuales *V*, *D*, *J* y *C*, y esto puede ser un factor en la respuesta de anticuerpos restringida de esta especie. En nítido contraste, en los pollos parece haber sólo un gen *V* operativo en el locus de la cadena ligera, pero sufre una amplia diversificación somática por el uso de seudogenes *V* no funcionales contiguos, en un proceso similar a la conversión génica somática. Los amantes de los camellos deben advertir que no sólo sobreviven con una pequeña cantidad de agua, sino que, al igual que las llamas, sobreviven también con anticuerpos que carecen de cadenas ligeras. Al parecer, el asa CDR3 especialmente larga en la región variable de la cadena pesada compensa la falta de la cadena ligera en esos anticuerpos.

La evolución de los distintos linajes de células T y B se acompañó del desarrollo de sitios separados para la diferenciación

Los efectos diferenciales de la bursectomía y la timectomía en el pollo sobre las respuestas humorales y celulares consiguientes permitieron reconocer los posibles linajes que cumplen estas funciones (Figura 11.20). Al igual que el timo, la bolsa de Fabricio se desarrolla como una evaginación embrionaria del endodermo intestinal, esta vez a partir del intestino posterior en lugar del intestino anterior, y proporciona el microambiente para preservar a las células madre entrantes y dirigir su diferenciación en linfocitos B inmunocompetentes. La bursectomía neonatal tuvo un profundo efecto en las concentraciones totales de inmunoglobulinas y en la producción

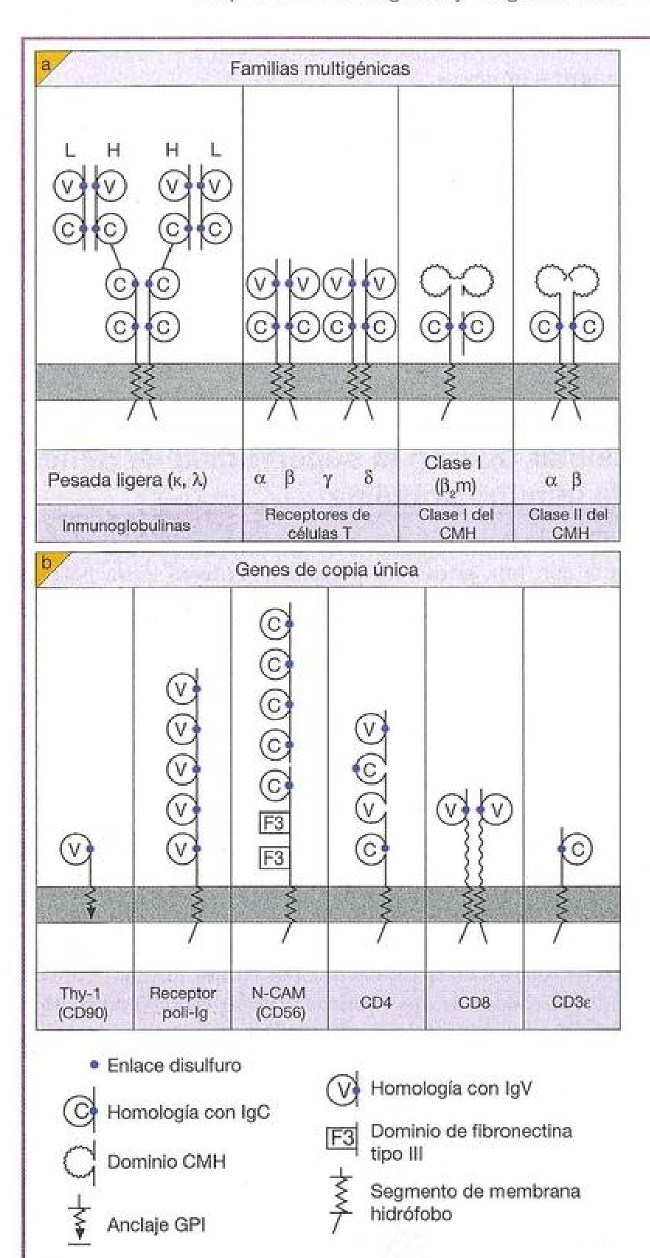


Figura 11.21. Superfamilia de inmunoglobulinas.

La superfamilia comprende un número grande de moléculas de superficie que comparte una estructura común, el dominio de tipo inmunoglobulina, lo cual sugiere la evolución de un único gen primordial ancestral. Se muestran sólo algunos ejemplos. (a) Familias multigénicas implicadas en el reconocimiento del antígeno (se incluye la copia única de β_2-microglobulina (β_2m) debido a su asociación con la clase I). (b) Genes de copia única. Thy-1 está presente en las células T y en las neuronas. El receptor poli-Ig transporta IgA a través de las mucosas. N-CAM es una molécula de adhesión presente en las neuronas, las células NK y en un subpoblación de células T. (Reproducido con autorización de *Nature* **323**, 15. © 1986, Macmillan Magazines Ltd., con alguna actualización.)

de anticuerpos específicos tras la inmunización, pero influyó de manera irregular en la respuesta de hipersensibilidad retardada mediada por células (HR) a la tuberculina o afectó el rechazo del injerto. Por otro lado, la timectomía comprometió de modo importante las reacciones mediadas por células e

inhibió la producción de anticuerpos contra la mayoría de los antígenos proteicos.

La localización anatómica distintiva del sitio de diferenciación celular en un órgano linfoide separado en el pollo fue de inmenso valor para realizar progresos en este campo porque permitió llevar a cabo los tipos de experimentos mencionados antes. Sin embargo, pasaron muchos años en la búsqueda infructuosa del equivalente de la bolsa de Fabricio en los mamíferos antes de que se comprendiera que el sitio primario de la generación de células B se hallaba en la misma médula ósea.

Las moléculas de reconocimiento celular utilizan la superfamilia de genes de inmunoglobulina

Cuando la naturaleza se pone en contacto de manera fortuita con una estructura proteica ("motivos" es la palabra clave) que media de manera eficiente alguna función útil, las fuerzas selectivas de la evolución aseguran que se la aproveche bien. Así, todas las moléculas que participan en el reconocimiento del antígeno que hemos descrito con detalle en los Capítulos 3 y 4 son miembros de una superfamilia de genes relacionados por su secuencia y, tal vez, por un ancestro común. Todos los miembros polipeptídicos de esta familia, que comprende las cadenas de Ig pesada y liviana, las cadenas del receptor de células T, las moléculas del CMH y la β_2-microglobulina, están compuestos por una o más unidades de homología inmunoglobulínica. Cada dominio de tipo Ig se halla constituido por alrededor de 110 aminoácidos de longitud y se caracteriza por ciertos residuos conservados alrededor de dos cisteínas situadas en cada dominio y aminoácidos hidrófobos e hidrófilos alternantes que dan lugar a las cadenas plegadas β antiparalelas familiares, con longitudes variables cortas intercaladas que tienen una marcada propensión a formar giros inversos: (el "**plegamiento inmunoglobulínico**".

Una característica muy importante de la estructura del dominio de Ig es la complementariedad mutua que permite interacciones no covalentes fuertes entre los dominios, como los que existen entre V_H y V_L y las dos regiones C_H3. La duplicación y la diversificación del gen pueden crear familias mutuas de moléculas que interactúan, como CD4 con la molécula de clase II del CMH, CD8 con la molécula de clase I del CMH e IgA con el receptor poli-Ig (Figura 11.21). Asimismo, las moléculas de adhesión intercelular ICAM-1 y N-CAM (Figura 11.21) tienen una buena dotación de estos dominios, y la larga historia evolutiva de N-CAM sugiere con firmeza que estas estructuras hicieron una aparición temprana en la filogenia como mediadores de reconocimiento celular. En las esponjas marinas, se encuentran estructuras de la superfamilia de Ig tanto en la porción extracelular del receptor de tirosincinasas (RTK) como en las moléculas de reconocimiento celular recientemente descritas (CRM; *cell recognition molecules*); se considera que ambas intervienen en el rechazo de aloinjertos. Un rastreo reciente del banco de datos de la secuencia de proteínas reveló centenares de miembros conocidos de la superfamilia de Ig. ¡Vaya familia!

Las **integrinas**, cuyos miembros abarcan el antígeno asociado a la función de los leucocitos-1 (LFA-1) y los antígenos muy tardíos (VLA), constituyen otra superfamilia estructural de la cual forman parte varias moléculas de la superficie de células hematopoyéticas relacionadas con la adhesión a las proteínas de la matriz extracelular y a los ligandos de la superficie celular; su función es dirigir los leucocitos a sitios tisulares determinados (véase la descripción en p. 190).

RESUMEN

Los antígenos CD ayudan a distinguir las diferentes poblaciones de leucocitos

- A las moléculas de la superficie celular definidas por anticuerpos monoclonales se les asignan números CD que pueden actuar como "marcadores" de la diferenciación celular.

Las células madre hematopoyéticas multipotenciales que provienen de la médula ósea dan origen a todos los elementos corpusculares de la sangre

- La expansión y la diferenciación son dirigidas por los factores de crecimiento solubles (estimuladores de colonias) y el contacto con las células reticulares estromáticas.

La diferenciación de células T tiene lugar dentro del microambiente del timo

- Los precursores de las células T que se originan de las células madre de la médula ósea necesitan dirigirse al timo bajo la influencia de las quimiocinas para su conversión en células T inmunocompetentes.

Ontogenia de las células T

- La diferenciación de las subpoblaciones de células T inmunocompetentes es acompañada por cambios en el fenotipo de superficie que puede ser reconocido con anticuerpos monoclonales.
- Los genes de TCR se reordenan en la corteza del timo, lo cual produce un TCR γδ o un pre-TCR αβ que consiste en un pre-Tα invariable asociado con un Vβ convencional antes del reordenamiento final del Vα para generar el TCR αβ maduro.
- Las células pre-T doble negativas $CD4^-8^-$ son inducidas y expandidas por señales mediadas por Notch y otras para convertirse en $CD4^+8^+$ doble positivas.
- Las células epiteliales del timo **seleccionan de manera positiva** células T $CD4^+8^+$ con avidez para su haplotipo del CMH, de modo que se desarrollan células T simple positivas $CD4^+$ o $CD8^+$ que están restringidas al reconocimiento del antígeno en el contexto del haplotipo de las células epiteliales.
- Las células NKT, que expresan TCR y marcadores celulares NK, como NK1.1, tienen regiones variables TCR altamente restringidas y reconocen antígenos glucolipídicos presentados por la molécula CD1d similar al CMH. Secretan IL-4 e IFNγ y pueden funcionar como células reguladoras.

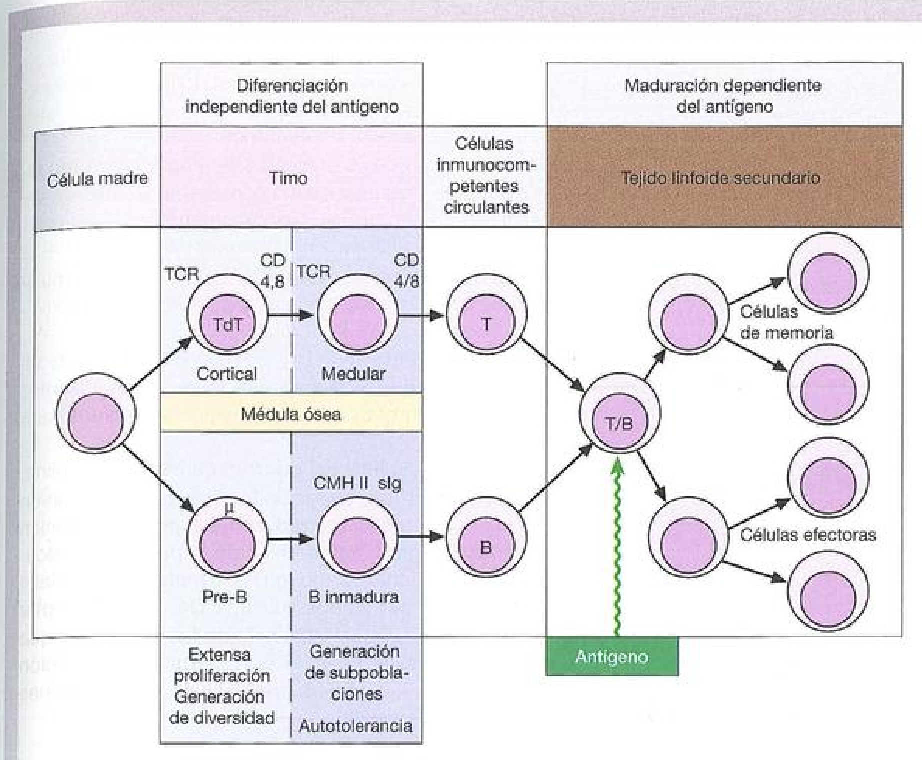


Figura 11.22. Diferenciación independiente del antígeno y maduración dependiente del antígeno de las células T y B.

Los timocitos corticales son seleccionados positivamente para reconocer el haplotipo propio del CMH. TdT, enzima desoxinucleotidil transferasa terminal.

Tolerancia de las células T

- Es necesaria la inducción de la tolerancia inmunitaria para evitar la autorreactividad.
- Las células T de alta avidez que reaccionan con los antígenos propios presentados por las células dendríticas medulares y los macrófagos son eliminadas por **selección negativa**. El paradigma de que la unión de baja avidez al complejo CMH-péptido produce selección positiva y alta avidez negativa es probablemente cierto en gran medida, pero puede requerir alguna enmienda.
- El regulador autoinmunitario (AIRE) dirige la expresión ectópica de varios autoantígenos organoespecíficos en las células del epitelio medular tímico que conduce a la deleción de las células T pertinentes.
- La autotolerancia también puede lograrse por anergia.
- Las células anérgicas adheridas a la célula dendrítica pueden inhibir la capacidad de la célula presentadora de antígeno, lo cual produce anergia infecciosa.
- Las células T reguladoras normalmente suprimen las actividades de las células T autorreactivas que escapan a los procesos de deleción o de anergia.
- Un estado en el cual se produce autotolerancia eficaz también aparece cuando existe una falla para presentar de modo adecuado un antígeno propio a los linfocitos, ya sea a causa del secuestro, la falta de moléculas de clase II en la célula presentadora de antígeno o la baja concentración del complejo péptido-CMH (epítopo críptico propio).

Las células B se diferencian en el hígado fetal y después en la médula ósea

- Las células B se convierten en inmunocompetentes después de pasar por los estadios de células pro-B, pre-B y B inmadura.
- La expresión de *Pax5* es esencial para la progresión del estadio pre-B al de célula B inmadura.

Las células B-1 y B-2 representan dos subpoblaciones distintas de células B

- Las células B-1 representan una población menor que expresa alta concentración de sIgM y baja concentración de sIgD. Las células B-1a son $CD5^+$ y las células B-1b son $CD5^-$. La mayoría de las células B convencionales, es decir, la población B-2, tiene un bajo contenido de $sIgM^{lo}$ y un alto contenido de $sIgD^{hi}$, y son $CD5^-$. La población B-1 predomina en la vida temprana, muestra un alto nivel de conectividad idiotipo-antiidiotipo, produce anticuerpos IgM polirreactivos de baja afinidad, muchos de ellos autoanticuerpos, y es la que determina los anticuerpos antibacterianos IgM "naturales" independientes de T que aparecen en forma espontánea.

Desarrollo de la especificidad de células B

- La secuencia de los reordenamientos del gen variable de Ig es *DJ* y luego *VDJ*.
- La transcripción *VDJ* produce cadenas μ que se asocian con las cadenas $V_{preB}.\lambda_5$ para formar un receptor de superficie sustituto similar a IgM.
- Este receptor señala la exclusión alélica de cadenas pesadas no reordenadas e inicia el reordenamiento de $V\text{-}J_\kappa$, y si no es productiva, de $V\text{-}J_\lambda$.
- Si el reordenamiento en cualquier estadio es improductivo, es decir, no conduce a un marco de lectura del gen aceptable, se reordena el alelo en la cromátide hermana.
- Los mecanismos de exclusión alélica aseguran que cada linfocito sea programado para un sólo anticuerpo.
- Las respuestas contra diferentes antígenos aparecen de manera secuencial con la edad.

Inducción de tolerancia en los linfocitos B

- La tolerancia de las células B es inducida por deleción clonal, anergia clonal, corrección del receptor y "falta de colaboración" (células B "desvalidas") debido a la inducción preferencial de la tolerancia de las células T necesarias para cooperar en la estimulación de las células B.

Ontogenia de las células *natural killer* (NK)

- Las células NK se diferencian en la médula ósea y expresan receptores inhibidores para las moléculas de clase I del CMH y receptores estimuladores para el reconocimiento de una diversidad de ligandos de la superficie celular.

Respuesta global en el neonato

- La IgG materna atraviesa la placenta y proporciona un alto nivel de inmunidad pasiva en el momento de nacer.
- La diferenciación independiente del antígeno dentro de los órganos linfoides primarios y la maduración inducida por el antígeno en los órganos linfoides secundarios se resumen en la Figura 11.22.

Evolución de la respuesta inmunitaria

- Incluso los organismos procariontes necesitan defenderse de la infección, por ejemplo, mediante el uso de endonucleasas de restricción para destruir el DNA extraño.
- Los vegetales utilizan la inmunidad activada por PAMP (PTI) respaldada por la inmunidad activada por el efector (ETI), que puede conducir a la resistencia adquirida sistémica (SAR) contra la infección que muestra amplia especificidad y dura varias semanas.
- El reconocimiento de lo propio es de importancia fundamental para los organismos multicelulares, incluso en las formas inferiores como las esponjas marinas.
- Los invertebrados tienen mecanismos de defensa basados en la fagocitosis, producen la muerte por una multiplicidad de péptidos microbicidas y atrapamiento del invasor por coagulación de la hemolinfa.
- Las respuestas de células B y T están bien definidas en los vertebrados, y la evolución de estos linajes distintos se acompañó con el desarrollo de sitios separados para la diferenciación.
- El éxito de la estructura del dominio de inmunoglobulina, posiblemente por su capacidad de formar una unión mutua no covalente, fue aprovechada por la evolución para producir la gran superfamilia de Ig para las moléculas de reconocimiento, como Ig, TCR, moléculas de clase I y II del CMH, β_2-microglobulina, CD4, CD8, receptor poli-Ig y Thy-1 Otra superfamilia, la de las integrinas, que abarca las moléculas LFA-1 y VLA, participa en la unión del leucocito con las células endoteliales y las proteínas de la matriz extracelular.

LECTURAS ADICIONALES

Bains I. et al. (2009) Quantifying thymic export: combining models of naive T cell proliferation and TCR excision circle dynamics gives an explicit measure of thymic output. Journal of Immunology 183, 4329–4336.

Blom B. & Spits H. (2006) Development of human lymphoid cells. Annual Review of Immunology 24, 287–320.

Boehm T. & Bleul C.C. (2007) The evolutionary history of lymphoid organs. Nature Immunology 8, 131–135.

Cumano A. & Godin I. (2007) Ontogeny of the hematopoietic system. Annual Review of Immunology 25, 745–785.

He X., Park K. & Kappes D.J. (2010) The role of ThPOK in control of CD4/CD8 lineage commitment. Annual Review of Immunology 28, 295–320.

Huntington N.D., Vosshenrich C.A.J. & Di Santo J.P. (2007) Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. Nature Reviews Immunology 7, 703–714.

Jones J.D.G. & Dangl J.L. (2006) The plant immune system. Nature 444, 323–329.

Kaushansky K. (2006) Lineage-specific hematopoietic growth factors. The New England Journal of Medicine 354, 2034–2045.

Majeti R., Park C.Y. & Weissman I.L. (2007) Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. Cell Stem Cell 1, 635–645.

Pancer Z. & Cooper M.D. (2006) The evolution of adaptive immunity. Annual Review of Immunology 24, 497–518.

Roozendaal R. & Mebius R.E. (2011) Stromal cell–immune cell interactions. Annual Review of Immunology 29.

Ruddle N.H. & Akirav E.M. (2009) Secondary lymphoid organs: responding to genetic and environmental cues in ontogeny and the immune response. Journal of Immunology 183, 2205–2212.

Singer A., Adoro S. & Park J.H. (2008) Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. Nature Reviews Immunology 8, 788–801.

Vera Göhre V. & Robatzek S. (2008) Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. Annual Review of Phytopathology 46, 189–215.

Zhang C.C. & Lodish H.F. (2008) Cytokines regulating hematopoietic stem cell function. Current Opinion in Hematology 15, 307–311.


Parte 2
Inmunología aplicada

booksmedicos.org

CAPÍTULO 12

Estrategias de los agentes patógenos durante la infección

Conceptos clave

A modo de resumen...

El sistema inmunitario cuenta con una amplia gama de células y moléculas a su disposición para combatir las infecciones. Los fagocitos endocitan patógenos pequeños, como bacterias, virus y hongos y, a continuación, utilizan una gran variedad de componentes microbicidas para destruir el organismo atrapado. Los patógenos que son demasiado grandes para ser endocitados, por ejemplo los gusanos parásitos, pueden ser destruidos por la liberación de sustancias tóxicas de células como los eosinófilos. Los anticuerpos también son eficaces contra los patógenos extracelulares y actúan sobre todo a través de sus efectos como opsonina para la fagocitosis y mediante el inicio de la vía clásica de activación del complemento. El complemento también puede ser activado en forma directa por los patógenos extracelulares, ya sea a través de las vías alternativas o de la lectina. El sistema inmunitario debe emplear diferentes estrategias para patógenos intracelulares, ya que éstos no suelen ser susceptibles a la acción de las células fagocíticas o de la inmunidad humoral. Los linfocitos T citotóxicos y las células NK matan las células huéspedes infectadas y, por consiguiente, privan al agente patógeno de la capacidad de replicarse. En el caso de bacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, que residen en los macrófagos, son valiosas las propiedades activadoras de los macrófagos del IFNγ.

Introducción

Estamos comprometidos en una guerra constante con los microbios que nos rodean, y los procesos de mutación y evolución tendieron a seleccionar los microor-

Roitt's Essential Immunology, Twelfth Edition. Peter J. Delves, Seamus J. Martin. Dennis R. Burton, Ivan M. Roitt.

Introducción *(continuación)*

ganismos que han desarrollado los medios para evadir nuestros mecanismos de defensa. Los patógenos continúan produciendo un impresionante número de víctimas (Figura 12.1), sobre todo en los países en vías de desarrollo. Entre las infecciones que han surgido recientemente, se incluyen las variantes del virus de influenza A (gripe) H1N1 y H5N1, *E. coli* O157:H7, *Clostidium difficile*, los priones, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia trachomatis*, HIV y virus de Ébola, que exigen elevados recursos sanitarios. Además, han reaparecido viejos adversarios, como el dengue, el virus del oeste del Nilo, el cólera, la peste, la fiebre del valle del Rift y la enfermedad de Lyme. Más de la mitad de todos los patógenos humanos son zoonosis, infecciones que están presentes en especies distintas de las del ser humano, pero que puede transmitirse a éste desde los animales. Los cambios climáticos que se producen en la actualidad debido al calentamiento global pueden provocar aumento en las enfermedades infecciosas transmitidas por vectores como el paludismo en muchas regiones del mundo, que incluyen Estados Unidos y Europa. En este capítulo se tratarán las estrategias variadas, y a menudo ingeniosas, que los agentes patógenos han desarrollado para sus ataques.

La infección sigue siendo un problema sanitario muy importante

A mediados del siglo pasado, pareció que la introducción de los antibióticos permitiría abatir finalmente a las enfermedades infecciosas, pero ahora la resistencia a múltiples fármacos se ha convertido en un problema preocupante, como se observa con la tuberculosis, el paludismo, *Streptococcus pneumoniae, Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). La resistencia a las sulfamidas apareció en *S. aureus* en la década de 1940; a la penicilina, en la de 1950; a la meticilina, en la de 1980, y a la vancomicina en 2002.

Las infecciones que se presentan después de las 48 horas de internación se describen como infecciones hospitalarias o nosocomiales; a menudo se deben a SARM y a otros microorganismos multirresistentes que acechan en estas instituciones, como *Clostridium difficile* tipo 027, que tiene una mutación que da por resultado la producción de niveles elevados de toxina. También es interesante que cada vez con mayor frecuencia se detecta la participación de agentes infecciosos en enfermedades "no infecciosas", como sucede con la asociación de *Helicobacter pylori* con las úlceras gástricas, el cáncer gástrico, o de algunos virus con diversas formas de cáncer.

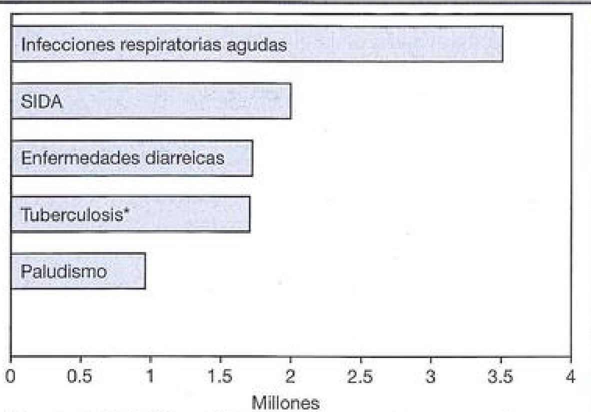


Figura 12.1. Estimación anual de muertes por enfermedades infecciosas.

Estas cinco enfermedades causaron casi el 90% de las muertes por enfermedades infecciosas en todo el mundo, según lo estimado por la Organización Mundial de la Salud durante 2008. *Se excluyen las muertes por tuberculosis en pacientes infectados por HIV. Para más información, véase http://www.who.int/ topics/infectious_diseases/en

Revisión de la inflamación

La reacción inicial contra los patógenos que infringen las barreras protectoras externas suele ser una respuesta inflamatoria aguda que implica el aflujo protector de los leucocitos, el complemento, los anticuerpos y otras proteínas del plasma hacia el sitio de infección o lesión. Esto se describió extensamente en los capítulos introductorios, pero ahora volveremos a examinar con mayor detalle los mecanismos de la inflamación. Puede ser de utilidad para el lector releer las secciones pertinentes en los Capítulos 1 y 2, en particular las relacionadas con las Figuras 1.21 y 1.22.

Mediadores de la inflamación

Una variedad compleja de mediadores participa en las respuestas inflamatorias agudas (Figura 12.2). Algunos actúan en forma directa en la pared del musculo liso que rodea las arteriolas para alterar el flujo sanguíneo. Otros actúan sobre las vénulas para causar la contracción de las células endoteliales con la apertura transitoria de las uniones interendoteliales y la consecuente trasudación de plasma. La migración de los leucocitos desde el torrente circulatorio es facilitada por los mediadores que estimulan la expresión de las moléculas de adhesión, tanto en las células endoteliales como en los glóbulos blancos y otros que conducen a los leucocitos hacia el sitio de inflamación por el proceso de quimiotaxis.

Los leucocitos se unen a las células endoteliales a través de moléculas de adhesión apareadas

Reencauzar los leucocitos que avanzan por la sangre hacia el sitio de inflamación es algo así como tener que animar a los toros que huyen en tropel por la calle principal de Pamplona para que pasen pacíficamente por las calles laterales. La adherencia de los leucocitos al endotelio de la pared

	Acción del mediador				
	Dilatación	Aumento de la permeabilidad	Sobreexpresión de las moléculas de adhesión: Endotelio	Sobreexpresión de las moléculas de adhesión: Neutrófilo	Quimiotaxis del neutrófilo
Histamina	+	+	++		
Bradicinina	+	++			
PGE2	+++	Potencia otros mediadores			
C5a		++	+	++	+++
Leucotrieno B4		++		++	+++
f. Met. Leu. Fen		++		+	+
Factor activador de plaquetas	+	++		++	
IL-8 (CXCL8)				+++	+++
NAP-2 (CXCL7)				++	++
IL-1β			++	++	
TNF			++	++	

Figura 12.2. Mediadores principales de la inflamación aguda.

El lector debe remitirse a la Figura 1.21 para recordar la diversidad de los productos generados por el mastocito. Las citocinas que actúan de modo más tardío, como la interleucina IL-1β provienen en gran medida de los macrófagos, y estas células también secretan prostaglandina E_2 (PGE_2), leucotrieno-B_4 y la quimiocina activadora de neutrófilos NAP-2 (CXCL7).

de los vasos sanguíneos a través de la interacción complementaria de la unión de las moléculas de la superficie celular es un paso absolutamente crucial. Varias clases de moléculas cumplen esta función, algunas de las cuales actúan como lectinas para unir un ligando de hidrato de carbono con una molécula complementaria.

Iniciación de la respuesta inflamatoria aguda

Un acontecimiento muy temprano es la sobreexpresión de la selectina-P y del factor activador de plaquetas (PAF) en las células endoteliales que revisten las vénulas por la histamina o la trombina liberadas como consecuencia del estímulo inflamatorio original. El reclutamiento de estas moléculas provenientes de las vesículas de reserva intracelular asegura que aparezcan en el término de minutos sobre la superficie de la célula. La ocupación del dominio similar a la lectina en el extremo de la molécula de selectina-P con los determinantes del hidrato de carbono sialil Lewis^x que contiene la glucoproteína selectina-P del ligando-1 (PSGL-1) situada en la superficie del neutrófilo causa la demora de la célula y su **rodamiento** a lo largo de la pared endotelial, a la vez que contribuye a que el PAF se fije en su receptor correspondiente. A su vez, esto aumenta la expresión superficial de integrinas como la molécula asociada a la función linfocítica-1 (LFA-1) y Mac-1, que unen de modo muy firme el neutrófilo con la superficie del endotelio (Figura 12.3).

La activación de los neutrófilos también aumenta su respuesta a los agentes quimiotácticos, y bajo la influencia de C5a y el leucotrieno B_4, salen de la circulación por movimientos activos a través de las brechas entre las células endoteliales, atraviesan la membrana basal (**diapédesis**) y, a favor del gradiente quimiotáctico, se dirigen hacia el sitio de inflamación. Aquí fagocitan a los microorganismos y utilizan sus diversos mecanismos microbicidas para destruir al patógeno. Además, liberan trampas extracelulares de neutrófilos (NET; n*eutrophil extracelular* t*raps*) que actúan como una telaraña para atrapar la presa y, por consiguiente, para evitar que se disemine (Figura 12.4). Las NET contienen varios agentes antimicrobianos como elastasa, catepsina G, mieloperoxidasa y lactoferrina, de tal modo que también contribuyen directamente con la destrucción de los microorganismos.

El daño del endotelio vascular, que expone la membrana basal, y las toxinas bacterianas, como el lipopolisacárido (LPS), activan las vías de la coagulación y de la fibrinólisis.

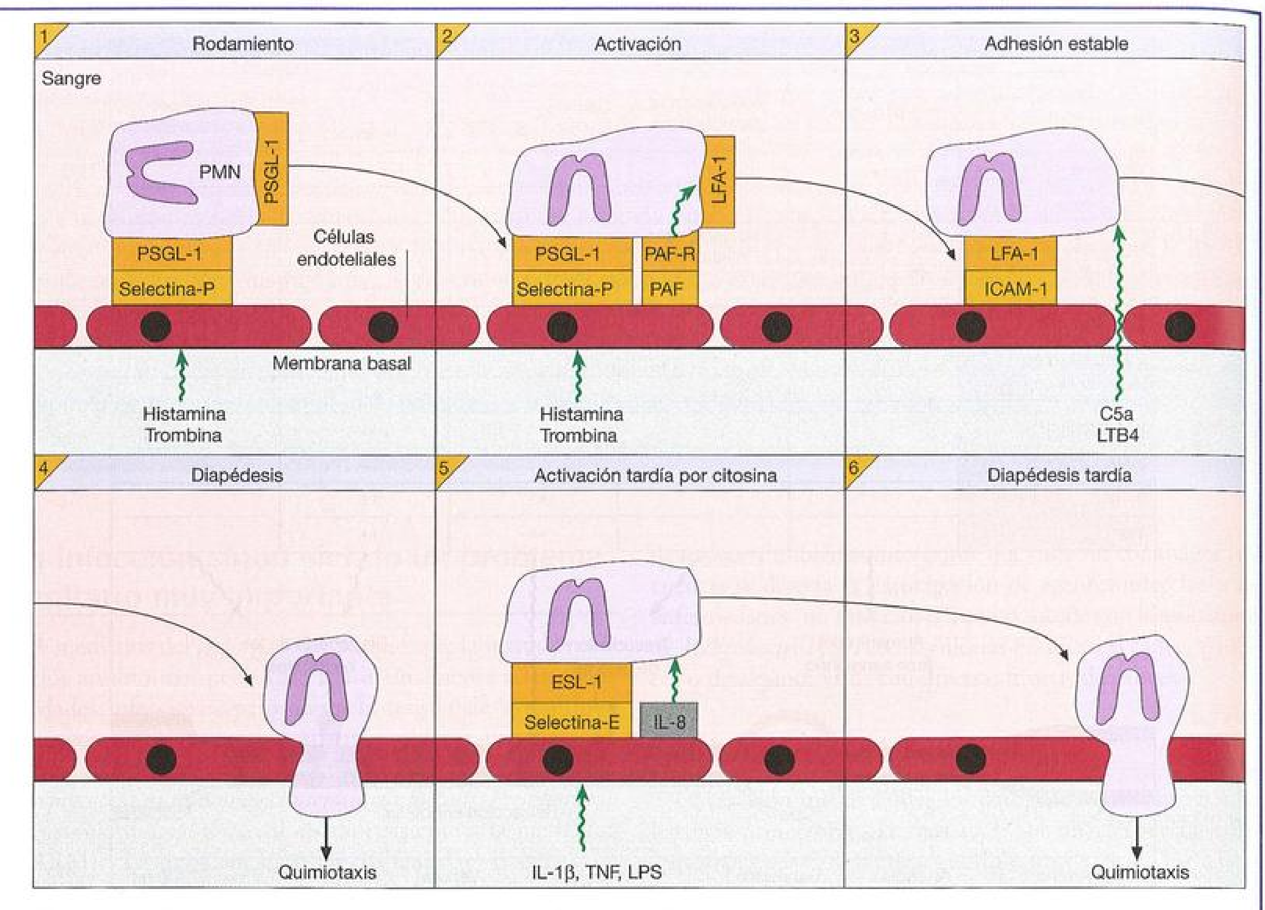


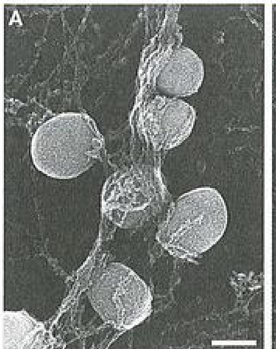
Figura 12.2. Mediadores principales de la inflamación aguda. Figura 12.3. Acontecimientos tempranos en la inflamación que afectan la marginación de los neutrófilos y la diapédesis.

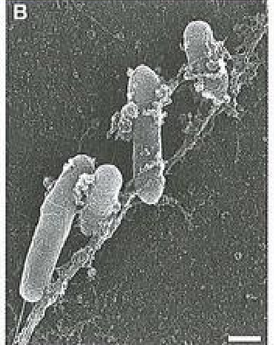
(1) Los mediadores como histamina y trombina inducen la sobreexpresión de la selectina-P en las paredes de los vasos sanguíneos. La interacción leucocito-endotelio (rodamiento) se produce después de la unión con los ligandos sobre los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) como la glucoproteína selectina-P del ligando-1 (PSGL-1, CD162). (2) La inducción ulterior del factor activador de las plaquetas (PAF) y su ocupación con el receptor PAF sobre los neutrófilos activa el leucocito, que da por resultado la expresión de integrinas, como el antígeno funcional de leucocito-1 (LFA-1). (3) También se expresa la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) sobre el endotelio, lo que permite una adhesión estable por medio de la interacción con el LFA-1. LA fracción C5a y el leucotrieno B_4 (LTB_4) crean un gradiente quimiotáctico que conduce a (4) la diapédesis de los neutrófilos activados. (5) La expresión ulterior de la selectina E endotelial (estimulada por IL-1β, TNF y LPS) y de IL-8 inducen la unión y la activación de más neutrófilos y (6) su diapédesis hacia el interior de los tejidos. (Compárense los procesos que participan en el asentamiento y la transmigración de los linfocitos, Figura 7.6.)

La activación de las plaquetas, por ejemplo, por el contacto con el colágeno de la membrana basal o endotelial inducido por el PAF, conduce a la liberación de muchos mediadores inflamatorios como histamina y diversas quimiocinas almacenadas en los gránulos. Algunos de los mediadores recién sintetizados como IL-1β son traducidos a partir del mRNA en las plaquetas anucleadas. Se produce la agregación de las plaquetas activadas y comienza la formación de **trombos** por la adherencia a través de la glucoproteína Ib de las plaquetas al factor de Von Willebrand en la superficie vascular. Estos tapones plaquetarios son aptos para detener la pérdida de sangre proveniente de una arteria dañada, pero en el sistema venoso el sitio dañado es sellado por un **coágulo de fibrina** que se forma mediante la activación del sistema de coagulación intrínseco por el contacto del factor de Hageman (factor XII) con la superficie expuesta de la membrana basal. El factor de Hageman activado también estimula los sistemas de cinina y plasmina, y varios de los productos resultantes influyen en el proceso inflamatorio, como la bradicinina y los fibrinopéptidos, que, junto con los componentes del complemento C3a y C5a, aumentan la permeabilidad vascular y la trombina, que contribuye a la activación del endotelio.

Proceso inflamatorio en curso

No debe ignorarse la función del macrófago tisular que, bajo el estímulo de una infección o una lesión local, secreta un conjunto imponente de mediadores. En particular, las citocinas IL-1β y el TNF actúan en un momento más tardío que la histamina o la trombina para estimular a las células endoteliales y mantener el proceso inflamatorio por





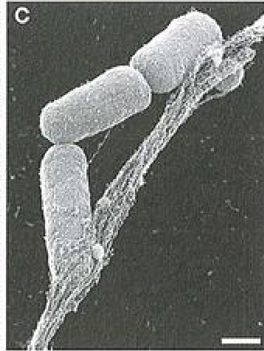


Figura 12.4. Trampas extracelulares de neutrófilos.

La liberación de las proteínas de los gránulos y la cromatina proveniente de los neutrófilos lleva a la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (*neutrophil extracellular traps*, NET) que impiden la diseminación bacteriana y aseguran que las sustancias microbicidas liberadas de los neutrófilos se mantengan en las vecindades de las bacterias para lograr la destrucción óptima de los microorganismos con un daño colateral mínimo en los tejidos del huésped. Microfotografía electrónica de barrido de las NET por atrapamiento de los neutrófilos activados por IL-8: A) *Staphylococcus aureus*; B) *Salmonella typhimurium*; C) *Shigella flexneri*. Las barras indican 500 nm. (Reproducido de Brinkman y col. [2004] *Science* **303**,1532, con autorización de los editores.)

regulación positiva de la selectina-E y la expresión sostenida de la selectina-P. Así, la expresión de la selectina-E tiene lugar 2-4 horas después de la iniciación de la inflamación aguda y depende de la activación de la transcripción génica. La selectina-E ocupa la glucoproteína del ligando-1 de la selectina-E (ESL-1) en el neutrófilo. Otros componentes de acción tardía son las **quimiocinas** (citocinas quimiotácticas) IL-8 (CXCL8) y el péptido activador de neutrófilos 2 (NAP-2, CXCL7), sustancias quimiotácticas altamente eficaces para los neutrófilos. La IL-1β y el TNF también actúan sobre las células endoteliales, los fibroblastos y las células epiteliales para estimular la secreción de otra quimiocina, MCP-1 (CCL2), que atrae los fagocitos mononucleares al sitio inflamatorio a fin de fortalecer y mantener la reacción defensiva contra la infección.

Quizá este sea un buen momento para recordar el importante papel de las quimiocinas (véase el Cuadro 9.2) en la atracción selectiva de múltiples tipos de leucocitos hacia el foco inflamatorio. Las quimiocinas inflamatorias son inducidas de manera típica por productos microbianos como lipopolisacárido (LPS) y por citocinas proinflamatorias como IL-1β, TNF e IFNγ. En una generalización muy amplia, las quimiocinas de la subfamilia CXC, como IL-8, son específicas para los neutrófilos y, en grados variables, para los linfocitos, mientras que las quimiocinas con el motivo CC son quimiotácticas para las células T, los monocitos, las células dendríticas y de manera variable para las células *natural killer* (NK), los basófilos y los eosinófilos. La eotaxina (CCL11) es quimiotáctica para los eosinófilos, y la presencia de concentraciones importantes de este mediador junto con RANTES (del inglés, r*egulates upon* a*ctivation* n*ormal* T-*cell expressed and* s*ecreted*; expresada y secretada por la célula T normal, regulada con la activación, CCL5) en las superficies de las mucosas podrían ser los determinantes del aumento de la población de eosinófilos en esos tejidos. Las diferentes quimiocinas se unen a glucosaminoglucanos particulares de sulfato de heparán y heparina de modo que, después de la secreción, el gradiente quimiotáctico pueda ser mantenido por la adherencia a la matriz extracelular como una forma de andamiaje.

Está claro que todo este funcionamiento sirve para concentrar las defensas inmunitarias alrededor de los microorganismos invasores. Éstos se recubren con el anticuerpo, C3b y ciertas proteínas de fase aguda y quedan listos para la fagocitosis por los granulocitos y los macrófagos; bajo la influencia de mediadores inflamatorios estas células sobreexpresan receptores para el complemento y Fc, incrementan las respuestas fagocíticas y presentan mayor poder de destrucción, todo lo cual no anuncia nada bueno para los microorganismos.

De hecho, resulta beneficioso reclutar linfocitos en los sitios de infección, y debemos recordar que las células endoteliales en estas áreas expresan VCAM-1, que actúa como un receptor de asentamiento para las células T de memoria activadas VLA-4 positivas, mientras que muchas quimiocinas son quimiotácticas para los linfocitos.

Regulación y resolución de la inflamación

Con su prudencia habitual, la evolución ha establecido mecanismos reguladores para impedir que la inflamación se descontrole. En el nivel humoral, hay una serie de proteínas del complemento reguladoras: inhibidor C1, proteína de unión C4b, los factores H e I de la proteína de control C3, receptor CR1 del complemento (CD35), factor acelerador de degradación (DAF, CD55), proteína cofactor de membrana (MCP, CD46), inmunoconglutinina y factor de restricción homólogo (HRF20, CD59). Algunas de las proteínas de fase aguda provenientes del trasudado plasmático, como antiquimiotripsinógeno α-1, antitripsina α-1, cofactor heparina-2 e inhibidor del activador de plasminógeno-1, son inhibidores de proteasas.

En el nivel celular, la PGE_2, el factor del crecimiento transformador β (TGFβ) y los glucocorticoides son reguladores poderosos. La PGE_2 es una inhibidora potente de la proliferación del linfocito y de la producción de citocina por

las células T y los macrófagos. El TGFβ desactiva los macrófagos mediante la inhibición de la producción de especies reactivas del oxígeno, la inhibición del transactivador de las moléculas de clase II del CMH (CIITA) y, en consecuencia, la inhibición de la expresión de las moléculas de clase II, lo que refrena el entusiasmo citotóxico de los macrófagos y de las células NK. Los glucocorticoides endógenos producidos por el eje hipotalámico-hipófiso-suprarrenal ejercen sus efectos antiinflamatorios a través de la represión de diversos genes para las citocinas proinflamatorias y las moléculas de adhesión, y la inducción de los inhibidores de inflamación lipocortina-1, inhibidor de proteinasa secretora del leucocito (SLP1, un inhibidor de la elastasa del neutrófilo) y el antagonista del receptor de IL-1. La IL-10 inhibe la presentación del antígeno, la producción de citocina y la destrucción con óxido nítrico (NO) por los macrófagos, inhibición ésta incrementada en gran medida por la acción sinérgica con IL-4 y TGFβ.

Una vez eliminado el agente que causó la reacción inflamatoria, estos procesos reguladores normalizaran el sitio. Cuando por su intensidad y magnitud la inflamación lesiona los tejidos, el TGFβ desempeña una función fundamental en la curación posterior de las heridas al estimular la división de los fibroblastos y el depósito de nuevos elementos de la matriz extracelular.

Inflamación crónica

Si un agente inflamatorio persiste, ya sea por su resistencia a la degradación metabólica o por la incapacidad de un sistema inmunitario deficiente para eliminar el microorganismo infeccioso, el carácter de la respuesta celular se modifica. El sitio queda dominado por macrófagos con una morfología variable: muchos tienen aspecto de activados, algunos forman las denominadas células "epitelioides" y otros se fusionan para originar células gigantes. También suele haber linfocitos de diversas características. Este **granuloma** peculiar aísla el agente persistente del resto del organismo huésped (véase la sección de hipersensibilidad de tipo IV en el Capítulo 15).

Respuestas protectoras contra las bacterias

La mayoría de las bacterias tiene una existencia extracelular que las hace susceptibles a las células fagocíticas y al complemento. Los neutrófilos y los macrófagos pueden emplear sus receptores de reconocimiento de patrón para reconocer directamente los patrones moleculares asociados con el patógeno presente sobre el microorganismo. El complemento puede ser activado por las vías alternativas o de la lectina. Sin embargo, la situación se torna incómoda para los microorganismos cuando entran en escena los anticuerpos, ya que entonces también puede activarse el complemento a través de la vía clásica, sin dejar de mencionar el hecho de que las bacterias se convertirán en forma muy efectiva opsonizadas para aumentar la fagocitosis. No obstante, los organismos no se quedan sin hacer nada al respecto, y hay una amplia gama de estrategias que se han desarrollado a fin de evitar su destrucción.

Estrategias para la supervivencia bacteriana

Como sucede en la mayor parte de los agentes infecciosos, si el lector piensa en una posible estrategia de evasión, seguro que algún microorganismo ya la habrá utilizado (Cuadro 12.1).

Cuadro 12.1. Ejemplos de mecanismos utilizados por las bacterias para evitar la respuesta inmunitaria del huésped. (Basado en parte en Merrell D.S. and Falkow S. [2004] *Nature* **430**, 250.)

Proceso inmunitario	Ejemplo	Mecanismo
Fagocitosis	*Yersinia*	Inhibición del esqueleto de actina en los fagocitos mediante escisión por YopT de RhoA (véase la Figura 12.8)
	Legionella	Los genes de multiplicación intracelular Dot/icm inhiben la fusión del fagolisosoma
Complemento	*Streptococcus pyogenes*	La proteína de unión M de la proteína de unión C4b reduce la actividad de la C3 convertasa
Apoptosis	*Shigella flexneri*	La activación de la caspasa-1 mediada por IpaB induce la apoptosis (véase la Figura 12.8)
	Mycobacterium tuberculosis	El aumento de la expresión de *bcl*2 y Rb inhibe la apoptosis
Producción de citocinas	*Vibrio cholerae*	La toxina del cólera inhibe la secreción de IL-12
	Bordetella pertussis	La toxina de pertussis induce a IL-1 e IL-4
Anticuerpos	*Staphylococcus aureus*	La opsonización por IgG para la fagocitosis es bloqueada mediante la unión "errónea" de la proteína A al anticuerpo
	Neisseria gonorrhoeae	Variación antigénica por recombinación dentro del gen *pilE*
Activación de células T	*Helicobacter pylori*	La citotoxina de vacuolización VacA inhibe las vías de señalización de la calcineurina

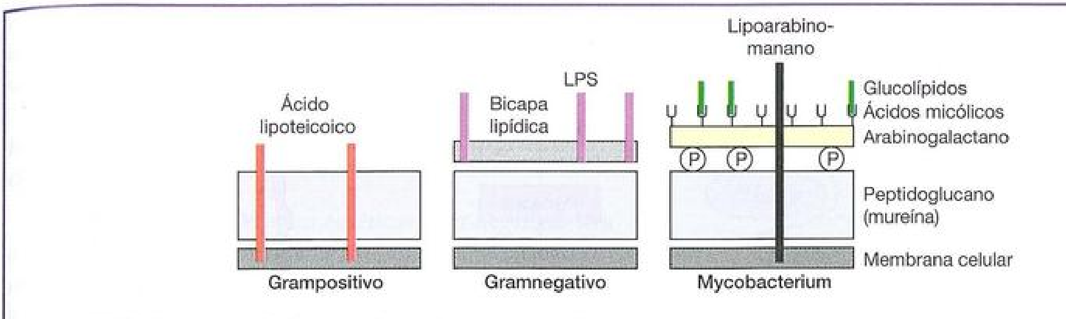


Figura 12.5. Estructura de las paredes celulares bacterianas.

Todos los tipos tienen una membrana celular interna y una pared de peptidoglucano que pueden ser escindidas por lisozima y enzimas lisosómicas. La bicapa lipídica externa de las bacterias gramnegativas, que es susceptible a la acción del complemento o las proteínas catiónicas, a veces contiene lipopolisacárido (LPS; también conocido como endotoxina; compuesto por un polisacárido hidrófilo distal a la membrana [que forma los antígenos O específicos altamente polimorfos] adherido a un núcleo polisacárido basal, que a su vez está unido a la molécula de lípido A hidrófobo de anclaje a la membrana; se conocen 179 variedades del antígeno O de *Escherichia coli*). La pared celular de las micobacterias es muy resistente a la degradación. Las bacterias grampositivas y gramnegativas a veces también poseen fimbrias o flagelos. Los tres tipos de paredes celulares bacterianas pueden estar recubiertos por una cápsula externa o no. Cuando están presentes, las cápsulas externas protegen a las bacterias de la fagocitosis.

Figura 12.6. Estrategias de evasión de la fagocitosis por las bacterias extracelulares.

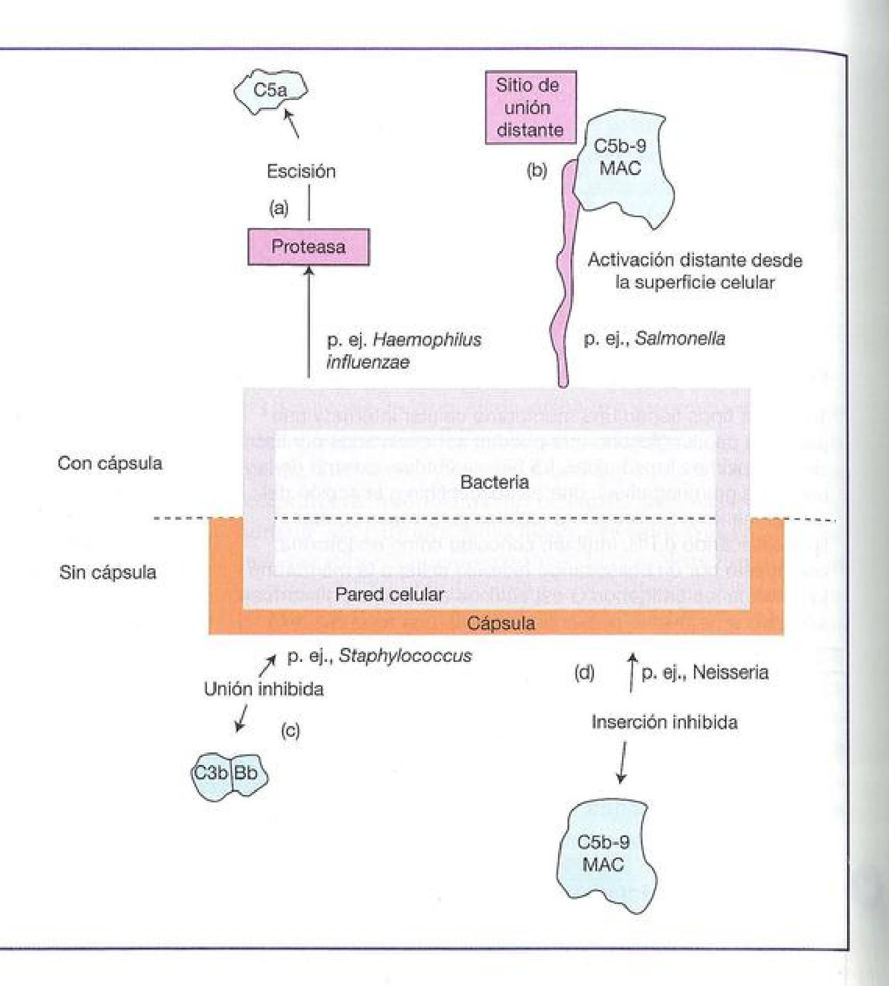
a) Los microorganismos se adhieren al componente de superficie para ingresar en la célula no fagocítica; b) inhibidor de la fagocitosis; c) la exotoxina envenena al fagocito; d) la cápsula brinda adherencia deficiente al fagocito.

Evasión de la fagocitosis

Las paredes celulares de las bacterias son múltiples (Figura 12.5), y en algunos casos, tienen una resistencia intrínseca contra diversos agentes microbicidas, si bien se utilizan muchas otras estrategias para evadir los mecanismos de defensa, sea mediada por fagocitos (Figura 12.6) o por complemento (Figura 12.7). Un mecanismo común por el cual las formas virulentas escapan de la fagocitosis es mediante la síntesis de una **cápsula** externa, la cual no se adhiere con facilidad a las células fagocíticas y recubre las moléculas de hidratos de carbono de la superficie bacteriana que, de otro modo, podrían ser reconocidas por los receptores del fagocito. Por ejemplo, sólo 10 neumococos encapsulados podrían matar a un ratón, pero, si se elimina la cápsula mediante el tratamiento con hialuronidasa, se requieren 10.000 bacte-

Figure 12.7. Estrategias de evasión del complemento por las bacterias extracelulares.

a) Degradación acelerada del complemento por acción de productos microbianos; b) los efectores del complemento provienen de la pared celular microbiana; c) la cápsula provee una superficie no estabilizante para la convertasa de la vía alternativa; d) la cápsula impermeabiliza a la célula frente al complejo de ataque a la membrana (MAC).



rias para esta tarea. Muchos patógenos desarrollan cápsulas que impiden el acceso físico de los fagocitos al C3b depositado sobre la pared celular bacteriana.

Otros microorganismos tienen moléculas activamente **antifagocíticas** sobre la superficie celular y otros hasta llegan a secretar **exotoxinas**, las que realmente envenenan a los leucocitos. Incluso otra artimaña consiste en ganar acceso a una célula no fagocítica y ocultarse, por lo tanto, del fagocito profesional. Es probable que algunos microorganismos intenten evitar la provocación indebida de las células fagocíticas mediante la adherencia y *la colonización de las superficies mucosas externas* del intestino.

Desafío al sistema complemento

Activación deficiente del complemento. Las células normales de los mamíferos están protegidas de la destrucción del complemento por proteínas reguladoras como MCP y DAF, que ocasionan la degradación de la C3 convertasa. Los microorganismos carecen de estas proteínas reguladoras de modo que, incluso en ausencia de anticuerpo, la mayoría de ellos activaría la vía alternativa del complemento mediante la estabilización de la $C3\overline{bBb}$ convertasa sobre sus superficies, por la activación de la vía de la lectina tras su interacción con los azúcares microbianos o por ambos mecanismos. Sin embargo, las cápsulas bacterianas en general tienden a ser activadoras deficientes del complemento y las presiones selectivas favorecen la síntesis de cápsulas cuyos componentes de superficie no facilitan la unión estable del complejo convertasa.

Aceleración de la degradación del complemento. Los miembros de la familia de reguladores de la activación del complemento (RCA; *regulators of complement activation*) que disminuyen la actividad de la C3 convertasa son la proteína de unión C4b (C4BP), el factor H y la proteína 1 similar al factor H (FHL-1). Ciertas moléculas de la superficie bacteriana, en especial las que tienen alto contenido de ácido siálico, se unen al factor H, que luego actúa como un foco para la degradación del C3b por el factor I serina proteasa. Esto se observa, por ejemplo, con *Neisseria gonorrhoeae.* De manera similar, las regiones hipervariables de las proteínas M de ciertas cepas de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo del grupo A) pueden unirse a FHL-1, mientras que otras cepas inhiben la activación del complemento por la interacción con C4BP, esta vez actuando como un cofactor para la degradación mediada por el factor I del componente C4b de la C3 convertasa de la vía clásica $C\overline{4b2a}$. Todos los estreptococos del grupo A, y los estreptococos de los grupos B, C y G de origen humano, producen una peptidasa C5a que actúa como factor de virulencia mediante la escisión proteolítica y, por lo tanto, la inactivación de la fracción C5a.

Desviación del complemento. Algunas especies logran evitar la lisis por la desviación del sitio de activación del complemento a una proteína señuelo secretada o a una posición en la superficie bacteriana distante de la membrana celular.

Resistencia a la inserción de los componentes terminales del complemento. Los microorganismos grampositivos (Figura 12.5) desarrollaron capas gruesas de peptidoglucano que

impiden la inserción del complejo lítico de ataque a la membrana C5b-9 en el interior de la membrana celular bacteriana. Muchas cápsulas hacen lo mismo (Figura 12.7).

Interferencia con los procesos en el interior del macrófago

En el intestino, las bacterias entéricas gramnegativas han desarrollado diversas maneras de influir en la actividad del macrófago, como inducción de la apoptosis, prevención de la fusión del fagolisosoma y alteración del citoesqueleto de actina (Figura 12.8).

Variación antigénica

Frente una determinada respuesta de anticuerpos del huésped, pueden modificarse antígenos individuales. Entre los ejemplos se hallan la variación de las lipoproteínas de superficie en la enfermedad de Lyme ocasionada por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi*, de las enzimas que intervienen en la síntesis de estructuras de la superficie en *Campylobacter jejuni* y de los pili en *Neisseria meningitidis*. Además, pueden originarse nuevas cepas, como ha sucedido con *E. coli* O157:H7, potencialmente mortal, que puede causar el síndrome urémico hemolítico y que parece haber surgido hace alrededor de 50 años por la incorporación de genes de la toxina de *Shigella* en el genoma de *E. coli* 055.

El contraataque del huésped

Los anticuerpos pueden vencer estos tortuosos esfuerzos de evitar la endocitosis mediante la neutralización de las moléculas antifagocíticas y su unión a la superficie de los microorganismos para focalizar el sitio de fijación del complemento, de modo que "opsoniza" los microorganismos para la ingestión por los neutrófilos y los macrófagos o los preparan para el complejo de ataque de membrana terminal (Avances y descubrimientos 12.1). Sin embargo, la producción de anticuerpos por las células B requiere comúnmente la colaboración de las células T, que necesitan ser activadas por las células presentadoras de antígenos.

Como ya se analizó en el Capítulo 1, pero tan importante que vale la pena repetirlo, los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), al igual que la endotoxina de fundamental importancia lipopolisacárido (LPS) de las bacterias gramnegativas, el peptidoglucano, los ácidos lipoteicoicos, los mananos, el DNA bacteriano, el RNA de cadena doble y los glucanos son moléculas ampliamente expresadas por los patógenos microbianos, pero que no están presentes en los tejidos del huésped. Así, estas moléculas actúan como un servicio de alerta para el sistema inmunitario, que detecta su presencia utilizando varios receptores para el reconocimiento de patrones (PRR) expresados en la superficie de las células presentadoras de antígenos. Debe recordarse que estos receptores abarcan el receptor de manosa (CD206), que facilita la fagocitosis de los microorganismos por los macrófagos, y el receptor depurador (CD204), que media la eliminación de las bacterias de la circulación. La proteína de unión del LPS (LBP) transfiere el LPS al CD14 PRR situado sobre monocitos, macrófagos, células dendríticas y células B.

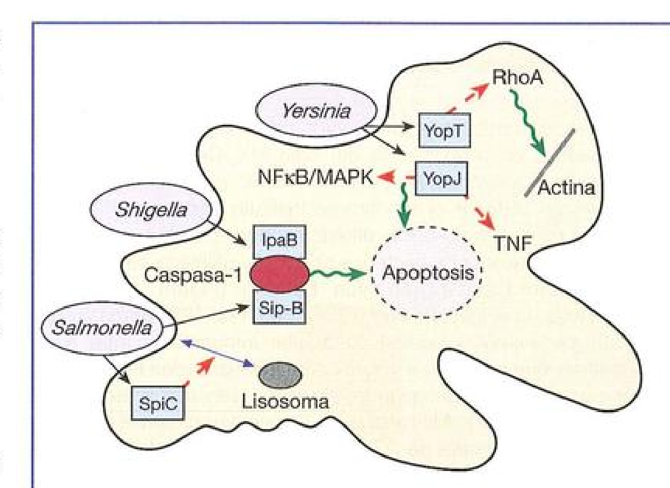


Figura 12.8. Evasión de las defensas del macrófago por las bacterias entéricas.

Las proteínas IpaB (antígeno B del plásmido de invasión) y SipB (proteína B de invasión de *Salmonella*) secretadas por *Shigella* y *Salmonella*, respectivamente, pueden activar la caspasa 1 y por eso contraponer una secuencia de acontecimientos que llevarán a la muerte del macrófago por apoptosis. La proteína SpiC (isla C de patogenicidad de *Salmonella*) inhibe el tránsito de las vesículas celulares y puede evitar así la fusión de los lisosomas con las vesículas fagocíticas. *Yersinia* produce varias moléculas Yop (proteínas externas de *Yersinia*) capaces de interferir con el funcionamiento normal del fagocito. Por ejemplo, YopJ inhibe la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) e inhibe el factor nuclear κB (NFκB y las cinasas MAP, lo cual facilita la apoptosis por inhibición de las vías antiapoptósicas. YopT impide la fagocitosis por la modificación de la GTPasa Rho que interviene en la regulación del citoesqueleto de actina. (Basado en Donnenberg M.S. [2000] *Nature* **406**, 768.)

Esto conduce al reclutamiento de la molécula del receptor de tipo Toll 4 (TLR4), que puede desencadenar la expresión de genes proinflamatorios, como aquellos para IL-1, IL-6, IL-12 y TNF y a la sobreexpresión de las moléculas coestimuladoras CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2). Aunque cada uno de los 13 receptores de tipo Toll caracterizados hasta ahora reconoce estructuras microbianas ampliamente expresadas, se sugirió que en conjunto pueden discriminar en cierta medida entre los diferentes patógenos mediante la detección de combinaciones particulares de PAMP de un modo aproximado a un "código de barras".

Neutralización de toxinas

Los anticuerpos circulantes pueden neutralizar las moléculas antifagocíticas solubles y otras exotoxinas (p. ej., fosfolipasa C de *Clostridium perfringens*) liberadas por las bacterias. La combinación cercana al sitio biológicamente activo de la toxina bloquearía la reacción estereoquímica con el sustrato, mientras que la combinación distante del sitio activo puede causar también la inhibición a través de cambios conformacionales alostéricos. En su complejo con el anticuerpo, la toxina puede ser incapaz de difundirse a distancia con rapidez y será susceptible a la fagocitosis.

Avances y descubrimientos 12.1—Efectos protectores de los anticuerpos

Las investigaciones que condujeron al reconocimiento de la protección antibacteriana ofrecida por los anticuerpos corresponden a los últimos años del siglo XIX. Un buen lugar para comenzar la historia es el descubrimiento realizado por Roux y Yersin en 1888, en el aún famoso Instituto Pasteur de París, de que la exotoxina del bacilo diftérico podía ser aislada a partir de un filtrado exento de bacterias del medio utilizado para el cultivo del microorganismo. Von Behring (Figura A12.1.1) y Kitasato, en el Instituto de Koch en Berlín en 1890 demostraron que los animales podían desarrollar inmunidad contra esas toxinas, que se debía a la formación de sustancias neutralizantes específicas, denominadas en forma genérica **anticuerpos** (Figura A12.1.2). Más adelante, procedieron con éxito a la transferencia pasiva de la inmunidad a otro animal mediante el suero que contenía la antitoxina. Los albores de la era de la seroterapia comenzaron en 1894, cuando Roux trató exitosamente a pacientes con difteria mediante la inyección de suero equino inmune.

Sir Almroth Wright (Figura A12.1.3), en Londres, en 1903, propuso que la acción principal del aumento de anticuerpos producidos después de la infección era reforzar la destrucción llevada a cabo por los fagocitos. Este autor denominó a los anticuerpos *opsoninas* (del griego *opson*, adobo o condimento) porque las bacterias eran preparadas como un alimento para las células fagocíticas, y comprobó ampliamente sus presunciones con la demostración de que los anticuerpos aumentaban de manera notable la fagocitosis de las bacterias *in vitro*, con lo cual relacionaba claramente la inmunidad innata con la adaptativa.

Incluso Bernard Shaw se refirió a la propuesta de Almroth Wright en su obra *The Doctor's Dilemma*. En el prólogo hizo una descripción evocadora de la función de las opsoninas: "[...] los corpúsculos blancos o fagocitos que atacan y devoran para nosotros los gérmenes de la enfermedad sólo hacen su trabajo cuando los untamos de modo apetitoso para ellos con una salsa natural que Sir Almroth denominó opsoninas [...]". (Relatos más extensos sobre la inmunología de fines del siglo XIX pueden encontrarse en Silverstein A.M. [2009] *A History of Immunology*. 2ª. ed. Elsevier.)



Figura A12.1.2. Behring extrayendo suero de un grifo.

Caricatura de Lustigen Blattern, 1894. (Epígrafe: "¡Suero directo del caballo! Recién extraído".)



Figura A12.1.1. Emil von Behring (1854-1917).

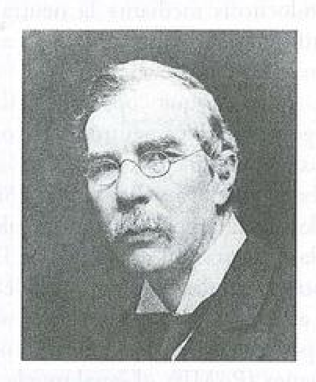


Figura A12.1.3. Sir Almroth Wright (1861-1947)

(Fotos proporcionadas por cortesía de The Wellcome Centre Medical Photographic Library, London.)

Opsonización de bacterias

Independiente del anticuerpo. Las diferencias entre las estructuras de los hidratos de carbono en las bacterias y las propias son aprovechadas por las **colectinas**, una serie de moléculas con ultraestructura similar a C1q y que tienen dominios de lectina en el C-terminal. Entre ellas se encuentra la lectina de unión a la manosa (MBL) que, con la unión a la manosa terminal de la superficie bacteriana, inicia la activación del complemento independiente de anticuerpo. Otras colectinas, las proteínas surfactante pulmonar SP-A y SP-D y, en los bovinos, la conglutinina, también reconocen ligandos de hidratos de carbono y todas pueden actuar como opsoninas (véase Avances y descubrimientos 12.1) mediando la fagocitosis por su unión al receptor C1q.

Incrementada por anticuerpos. Las bacterias encapsuladas que resisten la fagocitosis se tornan sumamente atractivas para los neutrófilos y los macrófagos cuando están recubiertas por anticuerpos y su velocidad de depuración del torrente circulatorio aumenta significativamente (Figura 12.9). La eliminación menos eficaz de las bacterias recubiertas en los animales con deficiencia del complemento destaca el sinergismo entre los anticuerpos y el complemento para la opsonización, que es mediada a través de receptores específicos

de alta afinidad para la fracción Fc de la inmunoglobulina y el complemento sobre la superficie de los fagocitos (Figura 12.10). Resulta claramente ventajoso que las subclases de inmunoglobulinas que se unen con firmeza a estos receptores Fc de la IgG (p. ej., IgG1 e IgG3 en los seres humanos) también fijen bien el complemento, y se aprecia que el heterodímero de C3b unido a la IgG es una opsonina sumamente eficaz porque ocupa dos receptores de manera simultánea. Los complejos que contienen C3b y C4b pueden mostrar adherencia inmunitaria a los receptores del complemento CR1 en los eritrocitos para proporcionar agregados que son transportados al hígado y al bazo, donde son fagocitados.

En esta etapa, puede ser pertinente un comentario sobre los **receptores para el complemento**. El receptor CR1 (CD35) para C3b también está presente en neutrófilos, eosinófilos, monocitos, células B y células dendríticas foliculares del ganglio linfático. Junto con el receptor CR3 (CD11b/CD18), desempeña el papel principal de proceder a la depuración de los complejos que contienen C3. El gen *CR1* se agrupa en la proteína de unión al C4b y el factor H, que en conjunto ejercen una función reguladora mediante la unión al C3b o al C4b para separar el ensamble de las convertasas C3/C5 y actuar como cofactores para la inactivación proteolítica de C3b y C4b por el factor I.

Los receptores CR2 (CD21) para iC3b, C3dg y C3d están presentes en las células B y las células dendríticas foliculares y transducen señales accesorias para la activación de las células B, en especial en los centros germinativos. Actúan como receptores para el virus de Epstein-Barr (EBV) por su unión a la glucoproteína de la cubierta viral gp350, lo cual facilita el ingreso del virus en la célula B, que con las moléculas de clase II del CMH actúan como correceptor de unión a la gp42.

Los receptores CR3 (CD11b/CD18 en neutrófilos, eosinófilos, monocitos y células NK) se unen a iC3b, C3dg y C3d. Están relacionados con LFA-1 y CR4 (CD11c / CD18, se unen a iC3b y C3dg) ya que son miembros de la subfamilia de las β_2 integrinas (véase el Cuadro 7.1). CR5 se encuentra en los neutrófilos y las plaquetas, y se une a C3d y C3dg. Se describieron otros receptores para el com-

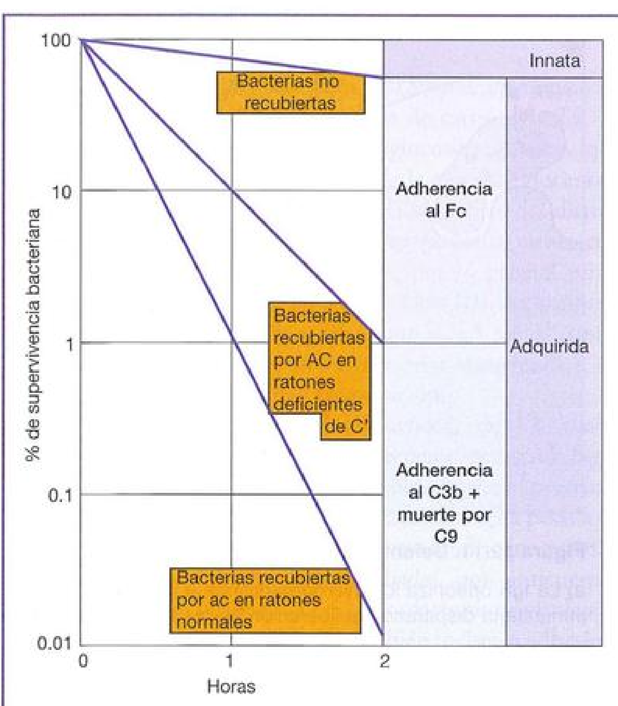


Figura 12.9. Efecto de los anticuerpos opsonizantes y del complemento sobre la velocidad de depuración de las bacterias virulentas de la sangre.

Las bacterias no recubiertas son fagocitadas con bastante lentitud (inmunidad innata), pero cuando están recubiertas por anticuerpos, la adherencia a los fagocitos aumenta muchas veces (inmunidad adquirida). La adherencia es menos eficaz en los animales con una disminución transitoria del complemento. Esta es una situación hipotética pero real; no se consideró la proliferación natural de las bacterias.

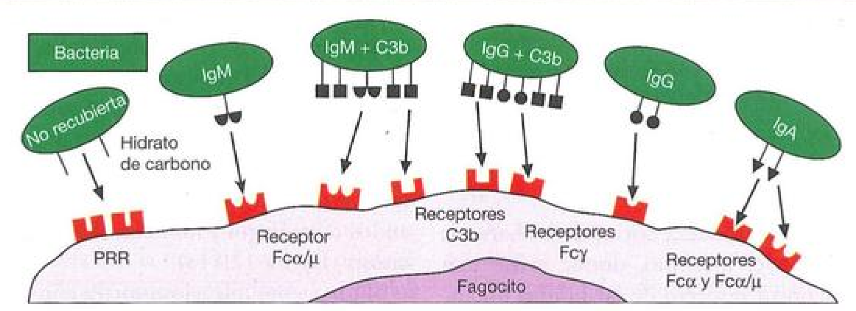


Figura 12.10. La inmunoglobulina y el complemento aumentan en gran medida la adherencia de las bacterias (y otros antígenos) a los macrófagos y los neutrófilos.

Las bacterias no recubiertas se adhieren a los receptores de reconocimiento de patrón (PRR, como diversos receptores de tipo Toll (TLR) y el receptor de unión a la manosa. El Fcα/μR sobre los macrófagos se une a las bacterias recubiertas por IgM (●●). Los receptores de alta afinidad para el Fc de IgG (●) y para C3b (CR1) e iC3b (CR3) (■) en la superficie del macrófago y del neutrófilo aumentan de manera considerable la fuerza de unión. El efecto aumentativo del complemento se debe al hecho de que dos moléculas adyacentes de IgG pueden fijar muchas moléculas de C3b, lo cual en consecuencia eleva el número de ligaduras al macrófago (véase "efecto de bonificación de la multivalencia"). Las bacterias opsonizadas con IgA (▼) pueden adherirse al fagocito mediante el Fcα/μR ya mencionado o por medio del Fcα/RI (CD89) presente en la superficie de macrófagos y de neutrófilos.

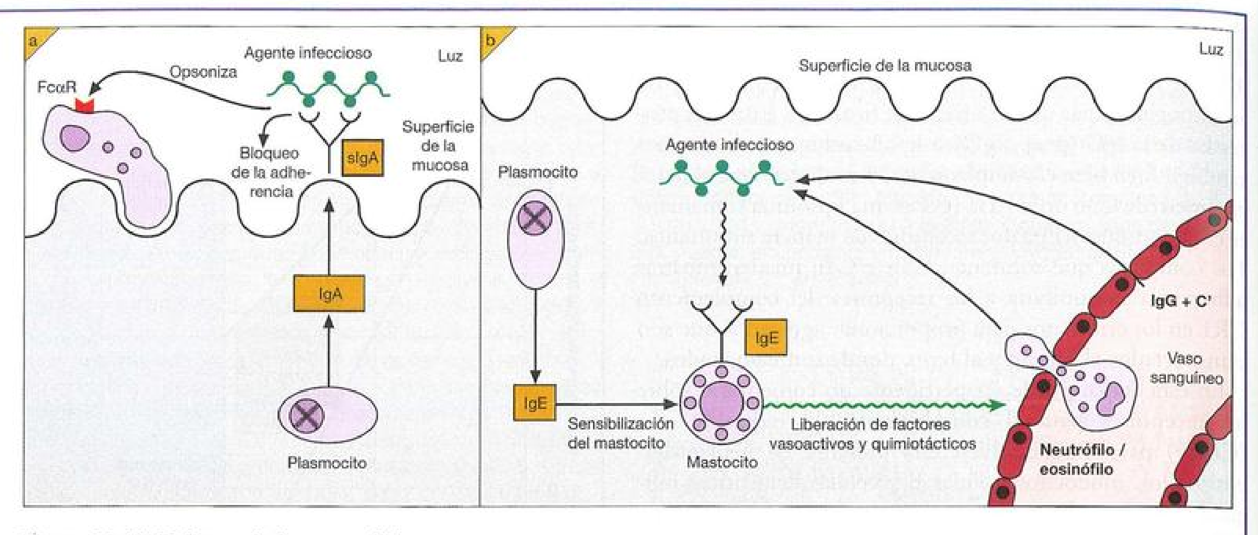


Figura 12.11. Defensa de las superficies mucosas.

a) La IgA opsoniza los microorganismos e impide la adherencia a la mucosa. b) La IgE recluta agentes de la respuesta inmunitaria disparando la liberación de mediadores provenientes de los mastocitos.

plemento, como algunos con especificidad para C1q, C3a y C4a, y la molécula CD88 con especificidad para C5a.

Algunos efectos adicionales del complemento

Algunas cepas de bacterias gramnegativas que tienen una pared externa lipoproteica, semejante a las membranas de los mamíferos en lo que respecta a la estructura, son susceptibles a la acción bactericida del suero recién obtenido que contiene anticuerpos. El anticuerpo inicia el desarrollo de una lesión mediada por complemento que permitiría el acceso de la lisozima a la parte interna de la pared de peptidoglucano de la bacteria para causar, por último, la muerte celular. La activación del complemento a través de la unión del anticuerpo y la bacteria también generará las anafilotoxinas C3a y C5a que conducen a una extensa trasudación de componentes séricos, incluso más anticuerpos, y a la atracción quimiotáctica de los neutrófilos para contribuir a la fagocitosis, como se describió con anterioridad en el caso de la inflamación aguda (véanse las Figuras 2.18 y 12.3).

El sistema inmunitario secretor protege las superficies externas de las mucosas

Ya hicimos mención a la naturaleza crítica de las barreras mucosas, en particular en el intestino, donde existe una interfaz que puede ser hostil respecto de las hordas microbianas. Con una superficie de alrededor de 400 m^2, alrededor de dos canchas de tenis, los epitelios mucosos del adulto representan la puerta de entrada más frecuente para los agentes infecciosos y los alergenos. Resulta obvia entonces la necesidad de que el sistema inmunitario de las mucosas tenga un ordenamiento adecuado y sea altamente eficaz.

Las superficies de la mucosa intestinal son defendidas por mecanismos tanto específicos como inespecíficos para el antígeno. Entre los inespecíficos, los péptidos antimicrobianos son producidos no sólo por los neutrófilos y los macrófagos, sino también por el epitelio de la mucosa. Como se describió en el Capítulo 1, el grupo de péptidos antimicrobianos denominados defensinas causan la lisis de las bacterias mediante la alteración de sus membranas de superficie. La inmunidad específica la proporciona la IgA secretora y la IgM, con un predominio de la IgA1 en los segmentos superiores y de la IgA2 en el intestino grueso. La mayor parte del resto de las mucosas también está protegida de manera predominante por la IgA, con excepción de los tejidos del aparato reproductor tanto masculino como femenino, donde el isotipo de anticuerpo dominante es la IgG. La envergadura de la tarea es subrayada por el hecho de que el 80% de las células B productoras de Ig está presente en la mucosa secretora y en las glándulas exocrinas. Los anticuerpos IgA ofrecen protección en los líquidos corporales externos, las lágrimas, la saliva, las secreciones nasales y las que bañan las superficies del intestino y los pulmones porque recubren las bacterias y los virus e impiden su adherencia a las células epiteliales de las mucosas, que son esenciales para la infección viral y la colonización bacteriana. Las moléculas de IgA secretora en sí mismas tienen una capacidad muy pequeña de adhesión innata para las células epiteliales, pero los receptores Fc de alta afinidad para esta clase de Ig están presentes en los macrófagos y los neutrófilos y pueden mediar la fagocitosis (Figura 12.11a).

Si un agente infeccioso sortea con éxito la barrera de IgA, se encuentra con la próxima línea defensiva del sistema secretor que está constituida por la IgE. En realidad, la mayor parte de la IgE sérica se origina a partir de los plasmocitos de las mucosas y en los ganglios linfáticos que las drenan. Aunque presente en baja concentración, la IgE se encuentra unida muy firmemente a los receptores Fc de los mastocitos, y el contacto con el antígeno conduce a la liberación de mediadores que reclutan de manera eficaz agentes de la respuesta inmunitaria y generan una reacción inflamatoria aguda local. Así, la histamina, que aumenta la perme-

abilidad vascular, causa la trasudación de IgG y complemento en el área, mientras que los factores quimiotácticos para los neutrófilos y los eosinófilos atraen las células efectoras necesarias para eliminar el microorganismo infeccioso recubierto con IgG específica y C3b (Figura 12.11b). La ocupación de los receptores Fcγ y C3b en los macrófagos locales por estos complejos lleva a la secreción de factores que refuerzan más esta permeabilidad vascular y los procesos quimiotácticos. En forma genérica, se diría que la exclusión inmunitaria en el intestino no es inflamatoria, pero la eliminación inmunitaria de los microorganismos que penetran la mucosa es proinflamatoria.

Cuando el microorganismo opsonizado es demasiado grande para ser fagocitado, los fagocitos pueden destruirlo por un mecanismo extracelular denominado citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), y existen pruebas de su participación en las infecciones parasitarias.

Los tejidos mucosos contienen diversas subpoblaciones de células T, pero su papel y el de las células epiteliales de las mucosas, además de la función de colaboración (*helper*) para la producción local de anticuerpos, es menos importante en la defensa contra las bacterias extracelulares.

Algunas infecciones bacterianas específicas

Primero veamos cómo se aplican estas consideraciones a la defensa contra la infección por microorganismos comunes como los estreptococos y estafilococos. Los **estreptococos β** hemolíticos fueron clasificados por Lancefield según su antígeno hidrato de carbono, y los más importantes en la enfermedad humana son los que pertenecen al grupo A. *Streptococcus pyogenes* causa con mayor frecuencia faringitis aguda (angina estreptocócica) y la enfermedad cutánea impétigo, pero también produce escarlatina y ha emergido como una de las causas del síndrome del shock tóxico, a menudo mortal, y de la siempre alarmante fascitis necrosante (enfermedad destructora de tejidos). La fiebre reumática y la glomerulonefritis a veces se presentan como secuela posinfecciosa grave.

El factor de virulencia más importante es la proteína M de superficie (variantes de la cual constituyen la base de la tipificación de Griffith). Esta proteína es un aceptor del factor H que facilita la degradación de C3b, y se une al fibrinógeno y sus fracciones que cubren los sitios que pueden actuar como activadores del complemento. En consecuencia, inhibe la opsonización, y la protección brindada por los anticuerpos contra el componente M se atribuye al aumento llamativo de la fagocitosis que estos inducen. Por lo tanto, la capacidad del estreptococo del grupo A para inducir autoanticuerpos que reaccionan en forma cruzada con la miosina cardíaca produce la enfermedad autoinmunitaria posestreptocócica. Los títulos elevados de anticuerpos contra la exotoxina estreptolisina O (ASO), que daña las membranas, son indicadores de infección estreptocócica reciente. Las exotoxinas pirógenas estreptocócicas SPE-A, SPE-C y SPE-H y la exotoxina mitógena estreptocócica SMEZ-2 son superantígenos asociados con la escarlatina y el síndrome del shock tóxico. Las toxinas son neutralizadas por anticuerpos, y la reacción intradérmica eritematosa con la inoculación de la toxina (reacción de Dick) sólo se observa en individuos que carecen de anticuerpos. Los anticuerpos también pueden neutralizar las enzimas bacterianas similares a la hialuronidasa que actúan en la diseminación de la infección.

Los estreptococos del grupo mutans (*Streptococcus mutans* y *S. sobrinus*) son una causa importante de caries dentales. El microorganismo contiene la enzima glucosiltransferasa, que convierte a la sacarosa en polímeros de la glucosa (glucanos), los cuales cooperan en la adhesión a la superficie del diente. Diversos ensayos clínicos realizados en pequeña escala con vacunas basadas en glucosiltransferasa, por lo general junto con componentes de las adhesinas fibrilares I/II del antígeno de superficie, pusieron de manifiesto que la IgA salival contra estreptococos del grupo mutans puede estar aumentada y, en algunos casos, interferir con la colonización.

Las formas virulentas de **estafilococos**, de los cuales *Staphylococcus aureus* es quizá la más frecuente, resisten la fagocitosis. Los estafilococos y los estreptococos expresan proteínas de superficie que se unen a la región Fc de la cadena pesada de IgG (proteína A y proteína G, respectivamente) y que podrían limitar las funciones efectoras mediadas por anticuerpos mediante la unión "errónea" a estos. Los factores de virulencia codificados por genes de *S. aureus* también incluyen adhesinas y ácido teicoico de la pared celular sobre la superficie de la bacteria, toxina-1 del síndrome del shock tóxico, enterotoxinas y enzimas. La proteína 2a de unión a la penicilina es capaz de sintetizar peptidoglucano incluso en presencia de antibióticos betalactámicos. Otros factores de virulencia son adquiridos a partir de los bacteriófagos lisogénicos, como la leucocidina de Panton-Valentine y la proteína inhibidora de la quimiotaxis (CHIP). Aunque *S. aureus* es fagocitado con facilidad en presencia de cantidades adecuadas de anticuerpos, una proporción pequeña de bacterias ingeridas sobrevive y son microorganismos difíciles de eliminar por completo. Cuando la infección es controlada inadecuadamente, pueden aparecer lesiones graves en el huésped inmunizado como consecuencia de reacciones de hipersensibilidad retardadas de tipo IV. Así, se encontraron estafilococos avirulentos cuando se inyectaban pasivamente anticuerpos en ratones inmunizados, pero causaban daño tisular extenso en animales a los que se les había administrado previamente células T sensibilizadas. Esta cepa "transgénica" de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM), que ya era resistente a todos los antibióticos betalactámicos, se ha vuelto ahora resistente a la vancomicina tras la transferencia de la resistencia al fármaco proveniente de *Enterococcus*. Se pueden utilizar nuevos fármacos como linezolid y SynercidR (quinupristina y dalfopristina) para tratar las infecciones por SARM, pero no hay garantía de que el microorganismo no se torne resistente también a estos agentes, cuestión bastante temible.

Otros ejemplos donde se requieren anticuerpos para vencer las propiedades inherentes antifagocíticas de las **cápsulas bacterianas** se observan en la inmunidad contra la infección por neumococos, meningococos y *Haemophilus influenzae*. *Bacillus anthracis* tiene una cápsula antifagocítica compuesta por un γ-polipéptido del ácido D-glutámico pero, aunque los anticuerpos anticapsulares estimulan de manera eficaz la captación por los neutrófilos, la exotoxina es tan potente que las vacunas son inadecuadas a menos que también estimulen la inmunidad antitoxina. Además de producir estas exotoxinas letales, *Pseudomonas aeruginosa* elabora

una elastasa que inactiva a C3a y C5a; como resultado, sólo se producen respuestas inflamatorias mínimas en ausencia de anticuerpos neutralizantes.

La táctica de **desviar la activación del complemento** hacia sitios insensibles se observa bastante bien con diferentes cepas de microorganismos gramnegativos como *Salmonella* y *Escherichia coli*, que varían en la cantidad de cadenas laterales de oligosacáridos específicos O adheridos al centro polisacárido ligado al lípido A de la endotoxina (véase la Figura 12.5). Las variantes con cadenas laterales largas son relativamente insensibles a la destrucción por el suero a través de la vía alternativa del complemento; a medida que la cadena lateral se torna cada vez más corta, aumenta la sensibilidad al suero. Aunque todas las variantes activan la vía alternativa, sólo las que presentan cadenas laterales cortas o carecen de éstas permiten que se inserte el complejo de ataque de membrana citotóxico cerca de la bicapa lipídica externa. Por otro lado, los anticuerpos concentran el complejo en un sitio más vulnerable.

La destrucción de los gonococos por el suero que contiene anticuerpos depende de la formación del complejo de ataque a la membrana, y los pocos individuos que carecen de C8 o C9 son susceptibles a la infección por *Neisseria. N. gonorrhoeae* (gonococo) se une de manera específica a las proteínas del complemento e impide su inserción en las membranas externas, pero los anticuerpos, como un "arreglatodo" ubicuo, corrigen esta situación, al menos en lo que concierne al huésped. Con respecto al proceso infeccioso propiamente dicho, la IgA producida en el aparato genital como respuesta a estos microorganismos inhibe la adherencia de las bacterias, a través de sus pili, a las células de la mucosa, pero parece incapaz de brindar una protección adecuada contra la reinfección. Esto parece deberse a un mecanismo de variación antigénica muy eficaz que altera la secuencia de la pilina expresada por conversión génica. Las proteínas asociadas a la opacidad de las colonias de gonococo (Opa) se unen a la isoforma de cola larga de CD66 que contiene los motivos de inhibición de inmunorreceptor basados en tirosina (ITIM) sobre las células T $CD4^+$ y, por consiguiente, inhibe su activación y proliferación. El fracaso para lograr una buena protección podría ser también el reflejo de la capacidad del gonococo para producir una proteasa que escinde una secuencia con alto contenido en prolina presente en la región de la bisagra de la IgA1 (pero no de la IgA2), aunque en la mayoría de los individuos la existencia de anticuerpos neutralizantes contra esta proteasa puede interferir con su actividad proteolítica. Los meningococos, que infectan frecuentemente la nasofaringe, *H. influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*, tienen proteasas IgA1 similares.

El **cólera** es causado por la colonización del intestino delgado por *Vibrio cholerae* y la acción posterior de su enterotoxina. Las subunidades B de la toxina se unen a los receptores específicos GM1 monosialogangliósidos y translocan la subunidad A a través de la membrana, donde activa la adenilciclasa. El aumento del cAMP produce entonces la pérdida de líquido por inhibición de la captación de cloruro de sodio y estimulación de la secreción activa de Cl^- por las células del epitelio intestinal. Los anticuerpos IgA

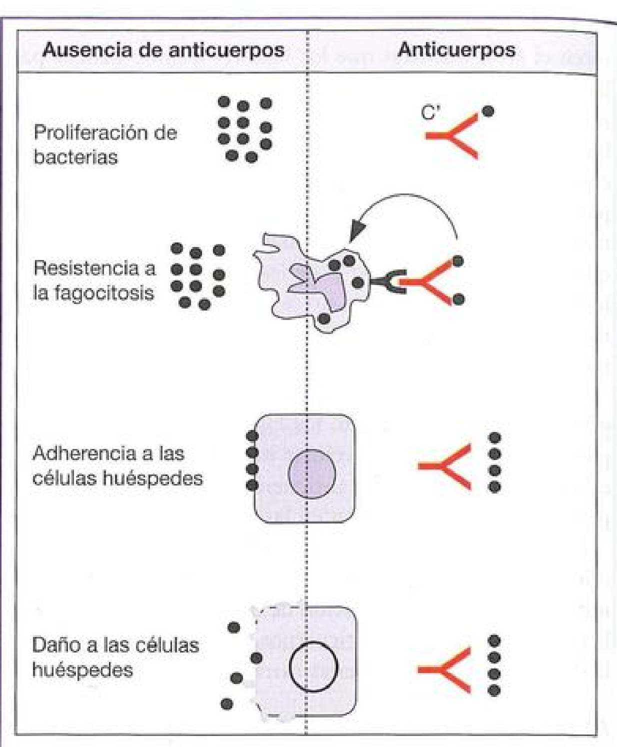


Figura 12.12. Defensas de anticuerpos contra la invasión bacteriana.

Los anticuerpos pueden evitar la proliferación de bacterias mediante, por ejemplo, el bloqueo de los mecanismos de transporte metabólicos como los receptores para compuestos quelantes de hierro y por la activación del complemento. La resistencia a la fagocitosis puede ser superada por la opsonización de las bacterias para el reconocimiento ulterior por los receptores Fc de los neutrófilos y los macrófagos. La producción de anticuerpos contra las fimbrias, el ácido lipoteicoico y las cápsulas pueden evitar la adherencia de las bacterias a las células huéspedes. Los anticuerpos neutralizantes contra las toxinas bacterianas pueden evitar el daño a las células huéspedes.

sintetizados a nivel local contra el lipopolisacárido y la toxina de *V. cholerae* proporcionan protección independiente contra el cólera, los primeros por inhibición de la adherencia bacteriana a la pared intestinal y los segundos por el bloqueo de la adherencia de la toxina a su receptor. Concordantes con este análisis son los datos epidemiológicos que muestran que los niños que ingieren leche con títulos elevados de anticuerpos IgA específicos para ambos antígenos son menos propensos a experimentar el cólera clínico.

En la Figura 12.12 se resumen las maneras por las cuales los anticuerpos pueden superar las diferentes facetas de la invasión bacteriana.

El hábitat de las bacterias intracelulares permite evitar muchas de las defensas del huésped

Varias especies bacterianas diferentes desarrollaron la capacidad de residir dentro de las células huéspedes. Aquí, ellas se ocultan de muchas de las defensas, como los anticuerpos, que el sistema inmunitario emplea regularmente

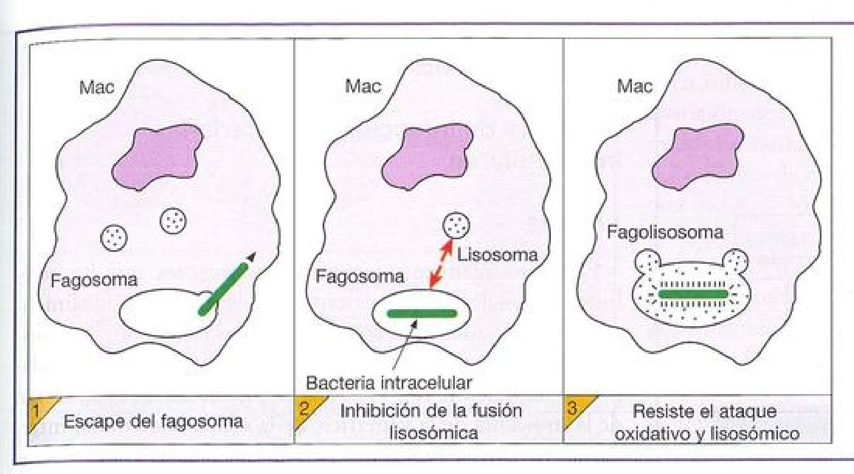


Figura 12.13. Evasión de la destrucción fagocítica por las bacterias intracelulares; Mac, macrófago.

contra patógenos. Sin embargo, no todo está perdido, porque el huésped tiene una serie de estrategias que pueden utilizar para hacer frente a esas bacterias; incluso, diversas respuestas mediadas por células.

Estrategias de supervivencia bacteriana

Yersinia y *Salmonella* figuran entre el numero selecto de patógenos bacterianos que desarrollaron mecanismos especiales para penetrar, sobrevivir y reproducirse dentro de **células del huésped** normalmente **no fagocíticas.** La primera gana acceso a través de la unión de su proteína de membrana externa, la invasina, a múltiples receptores integrina β_1 en la célula del huésped. *Salmonella*, por otro lado, induce la formación de diversas proteínas bacterianas como la proteína de invasión de *Salmonella* A(SipA), y las proteínas externas de *Salmonella*, SopA, SopB, SopD y $SopE_2$ estimulan procesos como reordenamientos del citoesqueleto y ondulación de la membrana para facilitar el ingreso en la célula huésped.

Algunas cepas de bacterias, como los bacilos de la tuberculosis y de la lepra, y los microorganismos *Listeria* y *Brucella*, escapan a la ira del sistema inmunitario mediante el descarado desarrollo de una vida intracelular dentro de una de sus fortalezas, nada menos que el macrófago. Los fagocitos mononucleares son una buena diana para estos microorganismos en el sentido de que son muy móviles y permiten la amplia diseminación en todo el organismo huésped. La entrada de bacterias opsonizadas es facilitada por la captación fagocítica tras la adherencia a los receptores de reconocimiento de patrón y, después de la opsonización, a los receptores Fcγ y C3b. Una vez en su interior, muchas desafían al poderoso macrófago alterando de diferentes formas los mecanismos de destrucción innatos. Los microorganismos como *Mycobacterium tuberculosis* neutralizan el pH en el fagosoma e inhiben la fusión posterior con los lisosomas (Figura 12.13). El peptidoglucano y los glucolípidos de la pared celular micobacteriana, como los lipoarabinomananos, inhiben la activación del macrófago. *Listeria monocytogenes* utiliza una lisina, la listeriolisina O, para escapar de su prisión fagosómica y quedar alegremente libre en el citoplasma; algunas rickettsias y el protozoo *Trypanosoma cruzi* pueden hacer lo mismo mediante otras lisinas. Ciertas bacterias, que tienen sobre todo un hábitat extracelular, pueden invadir células no fagocíticas. Un ejemplo es *Helicobacter pylori*, capaz de residir en células epiteliales que sirven como reservorio para la reinfección.

La defensa contra las bacterias intracelulares se produce por la inmunidad mediada por células T (IMC)

En una serie de experimentos sofisticados, Mackaness demostró la importancia de las reacciones de IMC para la destrucción de parásitos intracelulares y el establecimiento de un estado inmunitario. Los animales infectados por dosis moderadas de *M. tuberculosis* superan la infección y son inmunes a la exposición posterior con el bacilo. La inmunidad puede ser transferida a un receptor normal por linfocitos T, pero no por macrófagos ni por suero de un animal inmune. En apoyo del punto de vista de que la inmunidad específica es mediada por células T, está la mayor susceptibilidad a la infección con los bacilos de la tuberculosis y la lepra de ratones en los que se produjo una depresión de linfocitos T por timectomía más anticuerpos monoclonales contra las células T, o en los que se alteraron los genes TCR por recombinación génica homóloga (ratones con desactivación génica [*knockout*]).

Los macrófagos activados destruyen los parásitos intracelulares

Cuando los monocitos se establecen en el tejido definitivo para convertirse en "macrófagos residentes", están, en esencia, en un estado de reposo con capacidades microbicidas mínimas. Sin embargo, el desarrollo de un medioambiente inflamatorio producirá su activación, y el reclutamiento ulterior de células Th1 específicas para el patógeno conducirá a su activación completa. La producción de factores activadores de macrófagos, como IFNγ, TNF y linfotoxina, por estas células Th1 permite ahora que los macrófagos puedan destruir los microorganismos intracelulares obligados (Figura 12.14). Los mecanismos de muerte más importantes que se estimulan son aquellos mediados por las especies reactivas del oxígeno y los radicales NO·. Sin duda, el macrófago activado es una célula notable y extraordinaria, capaz de secretar alrededor de 60 sustancias vinculadas con las reacciones inflamatorias crónicas (Figura 12.15); ¡no es la clase de

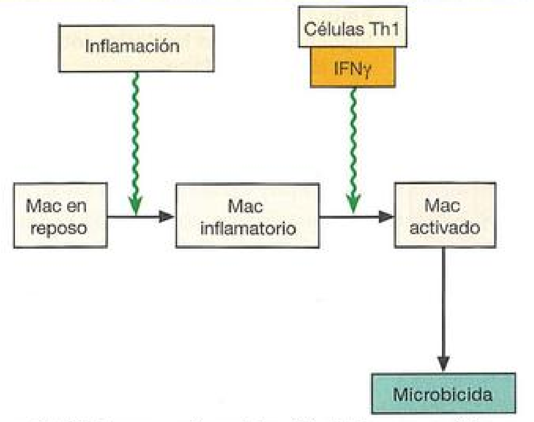


Figura 12.14. Fases en la activación de los macrófagos (Mac) para la función microbicida.

Los macrófagos tomados a partir de los sitios de inflamación presentan un aumento considerable del tamaño, del contenido de hidrolasa ácida, de la secreción de proteinasas neutras y de la función fagocítica. Como ejemplo, los receptores C3b en los Mac residentes no están libremente móviles en la membrana y de ese modo no pueden permitir el proceso "de cremallera" requerido para la fagocitosis (véase p. 13); en consecuencia, se unen pero no ingieren a los eritrocitos recubiertos por C3b. Por otra parte, los Mac inflamatorios contienen receptores C3 que muestran una considerable movilidad lateral y los eritrocitos opsonizados por C3 son fagocitados con facilidad. Además de la notable estimulación de los mecanismos de destrucción intracelular, se producen cambios destacados en los componentes de superficie como consecuencia de la activación secundaria a las citocinas, como IFNγ.

encuentro agradable en un callejón en una noche oscura!

Ahora se vuelve claro el mecanismo de la inmunidad mediado por células T en los experimentos de Mackaness. Las células T inducidas de manera específica reaccionan con el antígeno procesado, que procede de las bacterias intracelulares y se halla presente en la superficie del macrófago infectado en asociación con las moléculas de clase II del CMH; la liberación posterior de citocinas activa el macrófago y lo dota de la capacidad para destruir los microorganismos que ha fagocitado (Figura 12.16).

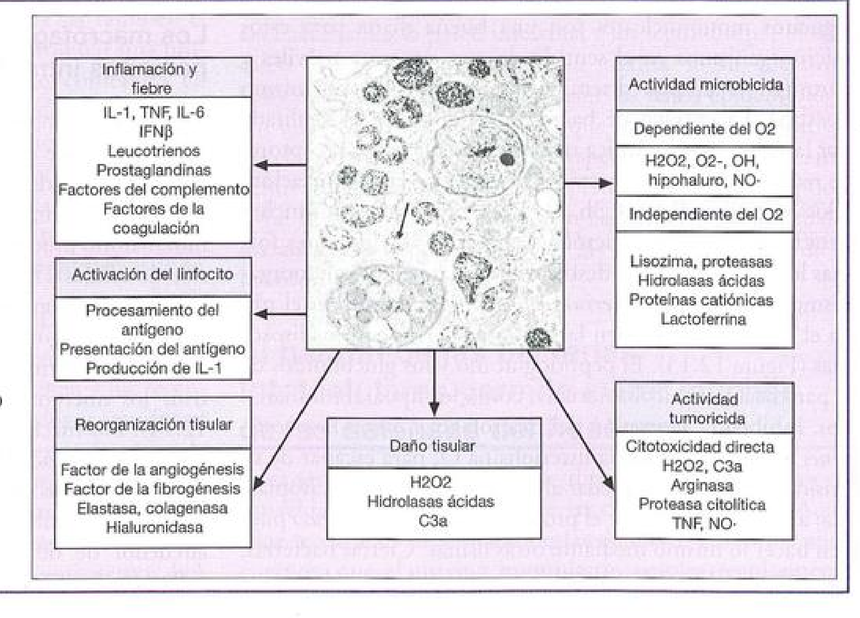
Ejemplos de infecciones bacterianas intracelulares

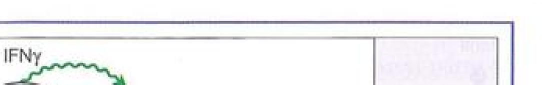
Listeria

El microorganismo *Listeria monocytogenes*, que los seres humanos suelen adquirir después de la ingestión de alimentos contaminados tales como productos lácteos sin pasteurizar, plantea un riesgo especial en las mujeres embarazadas por su asociación con el aborto séptico. Tras la interacción de la molécula de la superficie de la célula bacteriana, internalina A, con la cadherina E sobre las células epiteliales, el microorganismo atraviesa el epitelio e ingresa en la circulación sanguínea. Se produce la diseminación al bazo y al hígado, donde tiene lugar la internalización fagocítica en los macrófagos y en los hepatocitos por medio de la unión a otra molécula de la superficie microbiana, la internalina B, al receptor del factor de crecimiento del hepatocito. La proteína inductora del ensamble a la actina ActA producida por *Listeria* facilita su transmisión intercelular. El IFNγ secretado por las células NK y Th1 induce la activación de macrófagos requerida para la eliminación final del microorganismo *Listeria* intracelular (Figura 12.17). La acción bactericida de los neutrófilos y la función central de la IL-12 también exigen nuestra atención, ya que determinan el reclutamiento por la quimiocina CCL2 (MCP-1) de las células dendríticas que producen TNF y óxido nítrico. Se cree que estas u otras poblaciones de células dendríticas producen inducción cruzada de las células T CD8⁺ con los antígenos de *Listeria* provenientes de los macrófagos infectados. Durante la infección primaria, las células T CD8 que están restringidas a la molécula no clásica H2-M3 del CMH parecen desempeñar una función particularmente importante, mientras que las células T CD8 restringidas por las moléculas de clase I clásicas tienen una contribución más profunda durante la infección secundaria. Los ratones mutantes que

Figura 12.15. Función del macrófago activado en la iniciación y la mediación de la inflamación crónica, con la reparación tisular concomitante, y en la destrucción de microbios y células tumorales.

Es posible que los macrófago se diferencien por vías distintas para ejercer estas funciones diferentes. La microfotografía electrónica muestra un macrófago altamente activado con muchas estructuras lisosómicas destacadas por la captación del contraste torotrast; se observa una de ellas (flecha) en el momento de la fusión con un fagosoma que contiene el protozoo *Toxoplasma gondii*. (Cortesía del profesor C. Jones.)





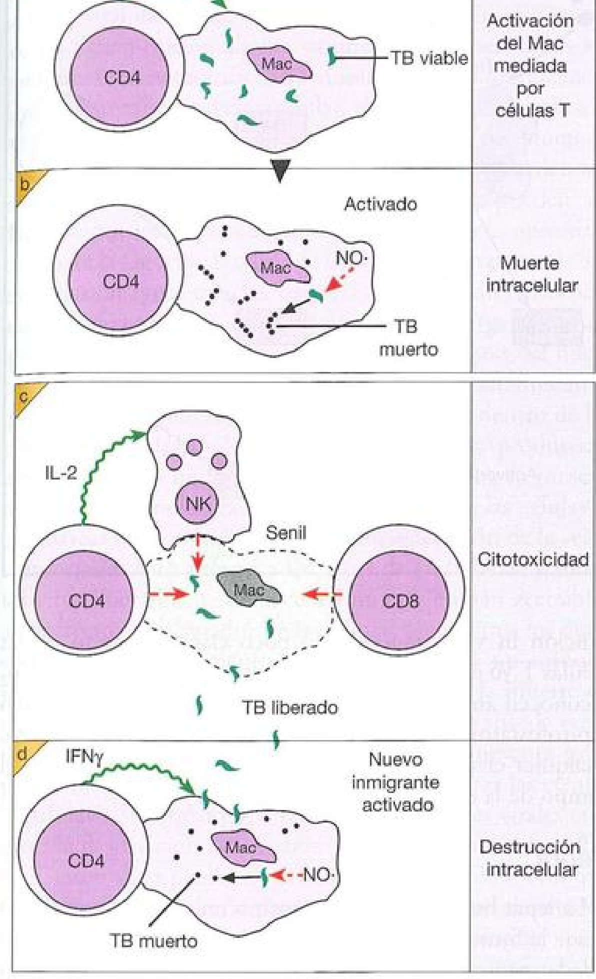


Figura 12.16. La "conexión citocina": destrucción inespecífica de las bacterias intracelulares por el macrófago murino inducida por una reacción de inmunidad específica mediada por células T.

a) La célula Th1 CD4 específica reconoce el péptido micobacteriano asociado con la molécula de clase II del CMH y libera IFNγ que activa el macrófago (Mac). b) El Mac activado destruye el bacilo de la tuberculosis intracelular, sobre todo a través de la generación de NO·. c) Un Mac "senil", incapaz de destruir las bacterias intracelulares, es destruido por células citotóxicas CD8 y CD4 y tal vez por células NK activadas por IL-2. Entonces, el Mac libera los bacilos tuberculosos vivos, que son captados y destruidos por el Mac recientemente reclutado susceptible a la activación por el IFNγ. d) Los monocitos humanos requieren de la activación por IFNγ e IL-4 más una señal mediada por CD23 para la inducción de iNO sintasa y la producción de NO·.

carecen de células T αβ o de ambas revelan que estos dos tipos celulares realizan contribuciones comparables a la resistencia contra la infección primaria por *Listeria*, pero que el TCR αβ es el que tiene una participación más importante en el aporte de inmunidad protectora. Las células T γδ controlan la respuesta tisular local en el sitio de replicación microbiana y los mutantes obtenidos por desactivación génica γδ desarrollan abscesos de gran tamaño cuando son infectados por *Listeria*.

Tuberculosis

La tuberculosis ha cobrado nuevo impulso ayudada por la aparición de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a múltiples fármacos. Se estimó que en 2009 se produjeron 1,7 millones de muertes como consecuencia de la enfermedad, que incluyen 380.000 pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida que fallecieron por tuberculosis.

Respecto de los mecanismos de defensa del huésped, como se observa con la infección por *Listeria*, los macrófagos murinos activados por IFNγ pueden destruir las micobacterias intracelulares, en gran medida mediante la generación de radicales NO· tóxicos. *M. tuberculosis* dentro del macrófago puede ser endocitado por autofagia en estas células, con la posterior fusión de lisosomas que contienen una variedad de compuestos microbicidas. Algunos macrófagos parasitados alcanzan un estadio en el que están demasiado incapacitados para ser estimulados por los mensajes de las células T y se desarrolla entonces una estrategia algo cruel en la que el huésped elabora células T citotóxicas CD8, y tal vez CD4 y NK, para ejecutar al macrófago desvalido y liberar las micobacterias vivas; éstas deben ser captadas ahora por las células fagocíticas inmigrantes recientes susceptibles de la activación por el IFNγ y eliminadas con rapidez (Figura 12.16). Una función vital tanto para las células T αβ como para las T γδ en la tuberculosis murina es indicada por la incapacidad de controlar la infección en ratones obtenidos por desactivación génica para la cadena β del TCR (que carece de TCR αβ) y para la cadena δ del TCR (que carece de TCR γδ).

Las cepas de ratones endocriadas difieren de manera notable en cuanto a su susceptibilidad a la infección por *Salmonella typhimurium, Leishmania donovani* y diversas micobacterias. La resistencia se asocia con un estado aumentado del macrófago, independiente de la célula T, para inducir la actividad bactericida en la que participan los radicales oxígeno y nitrógeno. Además, los macrófagos provenientes de cepas resistentes tienen una expresión mayor de moléculas de clase II del CMH y un estallido respiratorio mayor, son activadas con más facilidad por el IFNγ e inducen mejor la estimulación de células T. Por el contrario, los macrófagos provenientes de cepas susceptibles tienden a presentar efectos supresores sobre la proliferación de células T contra los antígenos micobacterianos. Los macrófagos infectados por *M. tuberculosis* secretan IL-6, que tiene la propiedad de inhibir la señalización de IFNγ en los macrófagos circundantes. La susceptibilidad y la resistencia contra *M. tuberculosis* en modelos murinos depende de varios genes, como *SLC11A1* (el miembro 1 de la familia 11 transportadora de soluto, un ion transportador de metales divalentes acoplados a protones denominado con anterioridad Nrampl) y genes en el locus génico *sstl* (susceptibilidad a la tuberculosis 1, también implicado en la inmunidad contra la infección por *Listeria monocytogenes*). Se identificaron varios polimorfismos en el gen humano *SLC11A1* y se están llevando a cabo estudios para relacionar los polimorfismos individuales con la susceptibilidad.

Cuando el huésped tiene dificultad para eliminar de manera eficaz estos microorganismos, la respuesta de IMC crónica contra el antígeno local conduce a la acumulación

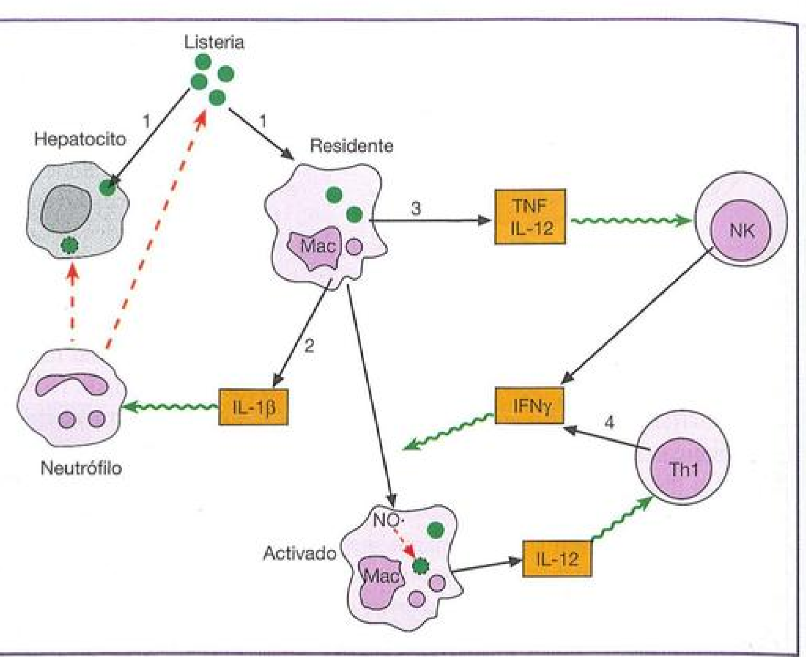


Figura 12.17. Activación macrofágica en respuesta a la infección por *Listeria*.

(1) *Listeria* infecta los macrófagos residentes y los hepatocitos; (2) los Mac liberan IL-1β que activa a los neutrófilos para destruir los bacilos de *Listeria* por contacto directo y son citotóxicos para los hepatocitos infectados; (3) los Mac infectados liberan TNF e IL-12 que estimulan a las células NK para secretar IFNγ que a su vez activa al macrófago para producir NO· y la muerte intracelular de *Listeria*; el IFNγ más la IL-12 derivados de los Mac reclutan células Th1 que refuerzan la activación del Mac a través de la producción de IFNγ (4). (Basado en un artículo de Rogers H.W., Tripps C.S. y Unanue F. R. [1995] *The Immunologist* **3**, 152.)

de macrófagos densamente compactados que liberan factores angiogénicos y fibrogénicos y estimulan la formación de tejido de granulación y, por último, fibrosis. Los macrófagos activados, probablemente bajo el estímulo de IL-4, se transforman en células epitelioides y se fusionan para dar lugar a células gigantes. Como se sugirió antes, el granuloma resultante representa un intento del organismo huésped para aislar un sitio de infección persistente.

La situación es más complicada en los seres humanos porque los macrófagos estimulados por IFNγ no pueden eliminar el microorganismo de la tuberculosis intracelular. La detección de la lipoproteína PAMP triacilada de *M. tuberculosis* por el heterodímero TLR1/TLR2 estimula la producción por el macrófago de citocinas proinflamatorias, como IL-1β, sintasa inducible de NO y la expresión de moléculas coestimuladoras. Además, el receptor de reconocimiento de patrón intracelular NOD2 reconoce el peptidoglucano micobacteriano muramil dipéptido que, de nuevo, causa la producción de citocinas proinflamatorias. Sin embargo, la interferencia con el fagosoma y la resistencia a la muerte por el macrófago asegura la supervivencia inicial de las micobacterias. No obstante, la exposición prolongada de los macrófagos a componentes de las micobacterias conduce a la inducción de TNFα y la muerte ulterior de los macrófagos por necrosis y apoptosis, lo que priva a las micobacterias de su refugio seguro.

Los productos micobacterianos Ag85B (una micolil transferasa) y ESAT-6 (*early secreted antigenic target*-6) son inductores potentes de IFNγ por las células T $CD4^+$. Las células T $CD8^+$ pueden reconocer los antígenos peptídicos micobacterianos presentados por las moléculas de clase I del CMH. Se describieron células T αβ que proliferan en respuesta a los antígenos micobacterianos que contienen lípidos como las didehidroximicobactinas presentadas por las moléculas CD1a del huésped y el ácido micólico presentado por las moléculas CD1b. Aunque *in vitro* estas células pueden secretar IFNγ y TNFα y pueden ser citotóxicas, su función in vivo sigue siendo poco clara. Respecto de las células T γδ en aquellos seres humanos con un TCR $V\gamma_2V\delta_2$ reconocen antígenos proteicos, pirofosfatos de isopentenilo y pirofosfatos de prenilo de *M. tuberculosis* pero, de nuevo, cualquier efecto protector posible *in vivo* permanece en el campo de la especulación.

Lepra

La lepra humana se presenta como un espectro que abarca desde la forma tuberculoide, con lesiones que contienen cantidades pequeñas de microorganismos viables, hasta la forma lepromatosa, caracterizada por una abundancia de *Mycobacterium leprae* dentro de los macrófagos. Para el control del bacilo de la lepra, es más importante la IMC que la humoral. Aunque el estado tuberculoide se asocia con buenas reacciones de hipersensibilidad cutánea mediadas por células y un desvío hacia las respuestas del tipo Th1, éstas aún no son lo suficientemente buenas para erradicar por completo a los bacilos. En la forma lepromatosa, existe una reactividad deficiente de células T contra el bacilo entero y mala respuesta cutánea a la lepromina, si bien la presencia de numerosos plasmocitos contribuye a la concentración elevada de anticuerpos circulantes e indica una actividad de Th2 más significativa. La expresión del receptor A2 similar a la Ig del leucocito (LILRA2) está aumentada en las lesiones de los pacientes lepromatosos, lo cual causa un bloqueo de la actividad antimicrobiana dirigida por TLR y una producción reducida de IL-12 proinflamatoria, pero un aumento de la secreción de IL-10 inmunosupresora por los monocitos.

Inmunidad contra la infección viral

Fuera de las células, los virus están rodeados por una cubierta proteica, la cápside. En el caso de los virus con envoltura, la cápside está encerrada por una bicapa lipídica que, aunque deriva de la membrana de la célula huésped,

también incorpora las proteínas virales requeridas para la adherencia celular. Todos los virus tienen que pasar parte de su ciclo vital dentro de las células huéspedes. En este aspecto, no tienen opción alguna ya que no se tienen todos los componentes necesarios para duplicar su ácido nucleico. Durante su existencia extracelular, el virus es susceptible a la neutralización por los anticuerpos capaces de bloquear la unión a los receptores de la célula huésped, pueden ser endocitados y destruidos por los fagocitos, y pueden ser dañados por los efectos del complemento (p. ej., opsonización para la fagocitosis o lisis de los virus con envoltura). Sin embargo, al igual que las bacterias intracelulares descritas antes, una vez dentro de las células que lo albergan, el virus queda efectivamente oculto de muchas respuestas del huésped. Además, muchos virus causan infecciones latentes en la que el genoma viral está en un estado inactivo dentro de las células huéspedes. Sólo tras la reactivación se producirán proteínas virales que pueden ser procesadas para su presentación por las moléculas de clase I del CMH a las células T citotóxicas CD8+ con la consiguiente destrucción de la célula infectada. Esto privará a los virus de su hábitat, y todos los virus liberados desde la célula muerta estarán accesibles a los efectos combinados de las células fagocíticas, los anticuerpos y el complemento. Aunque se trata de un enfoque más bien brutal en el que se nos implica con la muerte de nuestras propias células, siempre y cuando esto suceda razonablemente temprano en la infección no representa gran problema ya que, en general, podemos regenerar las células "perdidas". Sin embargo, durante las infecciones virales crónicas la destrucción de nuestras propias células por las células T citotóxicas puede ser demasiado amplia, de modo que la respuesta inmunitaria provoca más daño que el virus en sí, lo que conduce a un cuadro de inmunopatología.

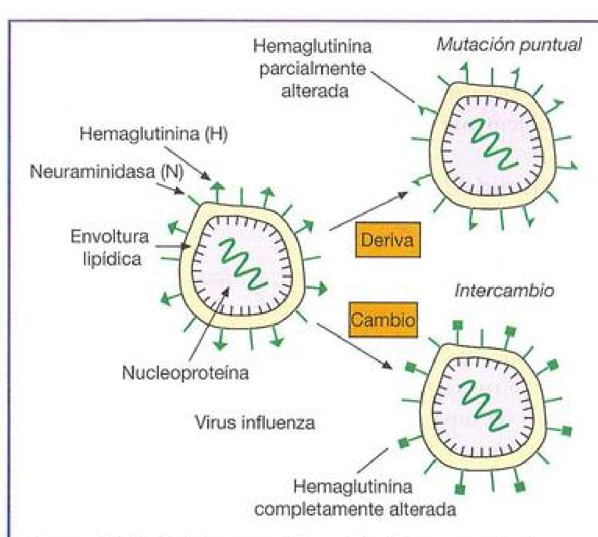


Figura 12.18. Deriva y cambio antigénicos en el virus influenza (virus de la gripe).

Las modificaciones en la estructura de la hemaglutinina causada por deriva (variación menor) pueden ser bastantes pequeñas para permitir la protección inmunitaria de las cepas más tempranas. Esto puede no suceder con las variaciones radicales en el antígeno asociadas con el cambio antigénico (variación mayor) y aparecen así brotes epidémicos por nuevos virus. Hubo 32 pandemias documentadas de gripe (epidemias extensas que ocurren a lo largo de la población) desde la descripción de la primera pandemia de 1580. Desde 1900 en adelante hubo cuatro, asociadas con la emergencia por cambio antigénico de la gripe española en 1918 con la estructura H1N1 (la nomenclatura oficial asigna números a cada variante mayor de hemaglutinina y neuraminidasa), la gripe asiática en 1957 (H2N2) y la gripe de Hong Kong en 1968 (H3N2) y la "gripe porcina" en 2009 (otra variante H1N1); obsérvese que cada nueva pandemia se asoció con un cambio fundamental en la hemaglutinina. La pandemia de 1918 causó la muerte de alrededor de 40 millones de personas.

Los virus constituyen un enemigo formidable

El HIV y el virus de la gripe, entre otros, pueden modificar rápidamente sus antígenos por mutación genética. Otros virus parecen afectarnos en forma desconcertante. Consideremos el síndrome respiratorio agudo grave (SRAG) causado por el coronavirus asociado al SRAG (SARS-CoV). Éste surgió como una infección humana en la provincia de Guangdong, en China, en noviembre de 2002, y se originó casi con certeza a partir de uno de los coronavirus afines encontrados en diversas especies animales. El virus se extendió con rapidez a Hong Kong y luego a Beijing, Hanoi y Singapur. Inmediatamente después fue introducido en Toronto por un viajero infectado. Por fortuna, la infección pudo ser controlada mediante el aislamiento de las personas infectadas y el rastreo de sus contactos, y la cadena de transmisión se interrumpió en julio de 2003. Según las cifras de la OMS, se enfermaron 8098 personas en 26 países, y 774 de éstas fallecieron. Apenas merece su mención si se compara con las 7000 muertes diarias provenientes de la infección por HIV; no obstante, la breve epidemia de SRAG tuvo un efecto económico sustancial, en particular en el Lejano Oriente, y es imposible predecir si habrá un brote futuro de SRAG y en qué momento se producirá.

Los factores constitucionales controlados genéticamente, que convierten a un huésped o a algunas de sus células en no permisivas (es decir, resistentes a que el virus se haga cargo de su maquinaria replicativa), desempeñan un papel predominante sobre la vulnerabilidad de un individuo dado a la infección. En los últimos tiempos se demostró que un grupo de proteínas, conocido como factores de restricción, proporciona una forma de resistencia innata a los retrovirus por su capacidad de bloquear la replicación de algunos tipos de virus. Así, la proteína TRIM5α (tripartite interaction motif 5α: motivo 5α de interacción tripartita) se dirige a la cápside retroviral en las células del mono y es la que determina la incapacidad del HIV-1 para infectar las células de la mayoría de los primates no humanos. Las citidina desaminasas APOBEC3 también actúan como factores de restricción, en este caso mediante la hipermutación del genoma retroviral.

Los macrófagos pueden captar con facilidad los virus de modo inespecífico y destruirlos. Sin embargo, en algunos casos, los macrófagos permiten la replicación, y si el virus es capaz de ejercer efectos citopáticos en diversos órganos, la infección puede ser letal; los agentes no citopáticos, como el virus de la coriomeningitis linfocítica, la enfermedad del visón aleutiano y la anemia infecciosa equina, pueden dar lugar a infecciones persistentes. Los virus pueden eludir el

reconocimiento por el sistema inmunitario del huésped mediante la latencia o el refugio en sitios privilegiados, pero también desarrollaron una serie de estrategias evasivas implacablemente hábiles.

La inmunidad puede ser evadida por variaciones antigénicas

Los virus influenza modifican los antígenos por deriva y cambio

En el curso de su duelo constante con el sistema inmunitario, los virus cambian continuamente la estructura de sus antígenos de superficie. Esto lo realizan por procesos denominados "deriva antigénica" (variación menor) y "cambio antigénico" (variación mayor). Por ejemplo, la superficie del virus influenza A contiene una hemaglutinina (H), por medio de la cual se adhiere a las células antes de la infección, y una neuraminidasa (N) que libera el virus recientemente formado del ácido siálico de la superficie de la célula infectada; de éstas, la hemaglutinina es la más importante para el establecimiento de la inmunidad protectora. Las variaciones menores en la antigenicidad de la hemaglutinina se producen a través de mutaciones puntuales en el genoma viral (**deriva**), pero las variaciones mayores (**cambios**) se originan por el intercambio de gran cantidad de material genético con reservorios de diferentes virus en otros huéspedes animales, como aves (p. ej., pollos, pavos y patos) y cerdos (Figura 12.18). Cuando las alteraciones en la hemaglutinina son suficientes para tornar ineficaz la inmunidad previa, aparecen nuevos brotes de pandemias de gripe, como sucedió en 1888, 1918, 1957 y 1968 tras los cambios antigénicos en el virus influenza A. En 1997, el virus aviar H5N1 infectó a los seres humanos en Hong Kong y ahora está presente en gran parte del mundo y causa algunos de los casos mortales. Hubo varios otros virus de gripe aviar que ocasionaron enfermedad y a veces muerte en los seres humanos, como el H9N2, en Hong Kong, en 1999 y 2003, el H7N7 en los Países Bajos en 2003, y el H7N3 en Canadá en 2004. En junio de 2009, la Organización Mundial de la Salud declaró la aparición de la pandemia mundial debida a una cepa nueva de H1N1 que se había originado en los porcinos. Por fortuna, la tasa de mortalidad asociada con este virus fue mucho menor de lo que se temía, aunque la próxima vez podemos no ser tan afortunados.

Rinovirus: el virus del resfriado común

Las mutaciones virales pueden verse favorecidas por la presión selectiva que ejercen los anticuerpos. De hecho, una estrategia actual para la generación de mutantes en un epítopo dado es permitir el desarrollo viral en cultivo de tejidos en presencia de un anticuerpo monoclonal que reaccione con ese epítopo; sólo los mutantes que no se unan al anticuerpo monoclonal escaparán y podrán proliferar. Este principio es la base de la variación antigénica característica de los rinovirus que causan el resfriado común. El sitio sobre el virus para la adherencia al receptor viral ICAM-1 en las células mucosas es un bolsillo hidrófobo que se encuentra en el piso de una depresión de la superficie viral ("cañón"). Tras la unión, el ICAM-1 cataliza la penetración del virus y fuerza a la cápside viral a permanecer en un estado abierto expandido con la liberación posterior del RNA viral. Los anticuerpos generados en respuesta a la infección por rinovirus a menudo son demasiados grandes para atravesar el cañón y muchos de ellos reaccionan con el margen del cañón viral. Las mutaciones en el margen permitirían al virus escapar de la respuesta inmunitaria del huésped sin afectar el sitio de unión a la célula diana. Sin embargo, se han identificado algunos anticuerpos monoclonales neutralizantes que toman contacto con una proporción significativa del cañón y se superponen directamente con el sitio de unión del ICAM-1. Se han sintetizado fármacos hidrófobos que se adaptan al cañón del rinovirus y causan un cambio en la conformación que evita la unión con las células; como las proteínas del huésped tienen plegamientos muy diferentes de los que presentan las moléculas de la cápside viral, los fármacos tienen una citotoxicidad limitada. En los últimos tiempos se ha diseñado un fármaco que se introduce en el sitio de unión de las proteasas 2A y 3C de los rinovirus, de modo que inhibe su actividad biológica.

La mutación puede producir epítopos no funcionales de las células T

Diversos agentes infecciosos, como los virus de la hepatitis B y C, el HIV y el agente del paludismo, pueden mutar sus epítopos que impiden la estimulación de las células T citotóxicas. Estas mutaciones modifican los residuos que podrían contribuir a la unión del péptido con el CMH o que puedan ser reconocidos después por el TCR.

Algunos virus pueden afectar el procesamiento o la presentación del antígeno

Casi todos los pasos del procesamiento y la presentación del antígeno pueden ser saboteados por un virus u otro (Figura 12.19). El citomegalovirus humano (HCMV) es particularmente adepto a esto, y produce una gama completa de proteínas que interfieren con el procesamiento y la presentación del antígeno. La vía de las moléculas de clase II del CMH no está exenta de la interferencia viral. La molécula Nef del HIV afecta el desplazamiento de la vesícula y el proceso endocítico involucrado en la generación de péptidos, mientras que la proteína EIA del adenovirus interfiere con la estimulación de la expresión de las moléculas de clase II del CMH mediada por IFNγ.

Los virus pueden interferir con los mecanismos efectores inmunitarios

Jugando con las respuestas humorales del huésped

Así como las bacterias tienen proteínas capaces de unirse a la región Fc del anticuerpo, ciertos virus también tienen estas moléculas. El virus del herpes simple (HSV) tipos 1 y 2, el virus de la pseudorrabia, el virus varicela-zóster y el citomegalovirus murino contienen proteínas que, por unión "errónea" con el anticuerpo, pueden inhibir las funciones efectoras mediadas por Fc.

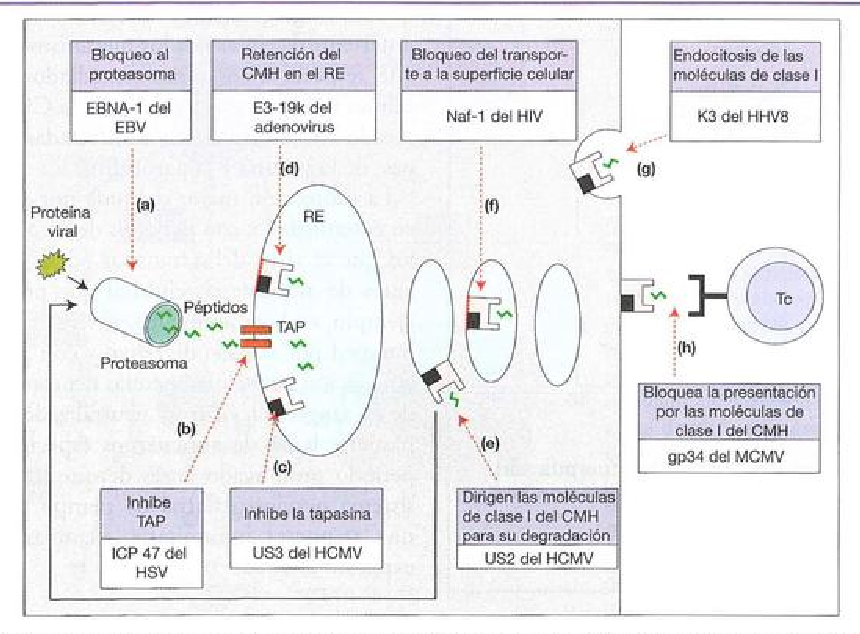


Figura 12.19. Interferencia viral con el procesamiento del antígeno y su presentación por las moléculas de clase I del CMH.

Muchos virus han desarrollado maneras de evitar la detección por las células T citotóxicas CD8+ y aquí ofrecemos algunos ejemplos entre las numerosas estrategias que se emplean. a) El antígeno nuclear-1 (EBNA-1) del virus de Epstein-Barr (EBV) contiene repeticiones glicina-alanina que inhiben el procesamiento de proteínas virales mediado por proteasoma. b) La unión del péptido a TAP es inhibida por la proteína de la célula infectada 47 (ICP47) del virus de herpes simple (HSV). c) El citomegalovirus (CMV) humano produce una proteína, US3, que inhibe la tapasina, un componente esencial del complejo péptido-carga. d) La proteína E3-19 K del adenovirus causa la retención de moléculas de clase I del CMH en el retículo endoplasmático (RE). e) La redirección de las moléculas de clase I hacia el citosol para la degradación por el proteasoma es la estratagema de la proteína US2 del CMV. f) La proteína Nef del HIV-1 causa la retención de las moléculas de clase I del CMH en el aparato de Golgi con orientación posterior a los lisosomas. g) Aunque se forma en la superficie celular, la molécula de clase I del CMH no es segura. La proteína K3 del herpesvirus 8 humano (HHV8) asociada al sarcoma de Kaposi puede eliminarla de la superficie celular mediante un proceso que implica la endocitosis y la ubicuitinacion. h) La proteína gp34 del CMV murino interfiere con el reconocimiento del complejo péptido-CMH por el TCR de la célula T citotóxica CD8+.

Como se mencionó en el caso de las bacterias, los virus pueden bloquear la inducción de la respuesta inflamatoria mediada por el complemento e impedir en consecuencia la destrucción viral. La proteína de control del complemento del virus de la vacuna (VCP) se une al C3b y al C4b, que transforma las C3 convertasas tanto clásica y de lectina ($\overline{C4b2a}$) como alternativa ($\overline{C3bBb}$) en susceptibles a la destrucción mediada por el factor I. Por su parte, el herpes simple tipo I altera la cascada del complemento por medio de su glucoproteína C de superficie que se une al C3b e interfiere su interacción con C5 y properdina.

Varios virus utilizan los receptores para el complemento a fin de ingresar en las células, en especial porque la ocupación del receptor para el complemento solo en un macrófago es un activador débil del estallido respiratorio. El EBV infecta las células B mediante la unión con los receptores de superficie CR2, mientras que los flavivirus recubiertos con iC3b penetran a través de los receptores CR3. De manera inquietante, el HIV recubierto con anticuerpo y complemento puede ser más virulento que el virus no opsonizado. A los anticuerpos que median este efecto se los denominan, por razones obvias, como "anticuerpos reforzadores". Los miembros de la familia de reguladores de la activación del complemento (RCA) son utilizados como receptores celulares por diversos virus, como CD46 (proteína cofactor de membrana) por el virus del sarampión y el herpesvirus humano-6 (HHV-6) y CD55 (factor acelerador de la degradación) por los echovirus y los virus coxsackie.

La inmunidad mediada por células también puede ser manipulada

El virus parainfluenza tipo 2 inhibe intensamente la función de las células Tc al inhibir la expresión de la granzima B. Los homólogos virales de las citocinas del huésped y sus receptores actúan como inmunosupresores. La proteína BCRF1 (vIL-10) del EBV tiene una homología del 84% con la IL-10 humana y ayuda a que el virus escape de los efectos antivirales del IFNγ mediante la inhibición de las células Th1. Los poxvirus codifican homólogos solubles tanto para el receptor IFNα/β como para el IFNγR y, en consecuencia, inhiben competitivamente la acción de los tres interferones. El ortopoxvirus humano elabora una proteína de unión a la IL-18 (IL-18BP) que inhibe la producción de IFNγ inducido por la IL-18 y las respuestas de NK. Los herpesvirus y los poxvirus contienen varios genes que codifican proteínas similares a las quimiocinas y proteínas similares a los receptores para quimiocinas que pueden alterar la acción de numerosas quimiocinas. La lista continúa. Las estrategias anti-IFN son particularmente abundantes y muchos virus producen proteínas capaces de bloquear las vías de activación JAK/STAT inducidas por IFN. Un obje-

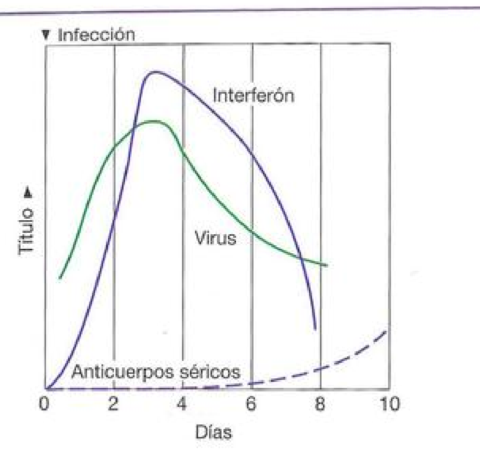


Figura 12.20. Aparición de interferón y anticuerpos séricos en relación con la recuperación de la infección por el virus influenza de los pulmones de ratones.

(De Isaacs A. [1961] *New Scientist* **11**, 81.)

tivo viral fundamental es también la activación de la proteincinasa dependiente del RNA de doble cadena (PKR) y otros componentes de la célula que intervendrían en la preparación de un estado antiviral en las células después de su exposición al IFN. Cuando el virus de la fiebre porcina africana infecta los macrófagos, su proteína A238L inhibe las vías de activación celular tanto NFκB como la dependiente de la calcineurina. El genoma de este virus también codifica un homólogo del antígeno CD2 (vCD2) que interfiere con la función de los linfocitos.

La apoptosis de una célula podría considerarse como una mala noticia para el virus que vive muy cómodamente en su interior. Por lo tanto, de nuevo no es sorprendente que los virus hayan establecido maneras de evitar la apoptosis. Sólo un par de ejemplos: el HHV8 produce una proteína viral inhibidora de FLICE (vFLIP), que es un homólogo del predominio de la caspasa 8 y por lo tanto protege las células contra la apoptosis, mientras que el ASFV produce homólogos de IAP y bcl2 con el objeto de inhibir la apoptosis. Por el contrario, algunas de las proteínas virales como Vpr del HIV-1 y HBx del HBV son proapoptósicas, en este caso quizá porque colaboran con la diseminación de las partículas virales.

Protección por anticuerpos séricos

Los anticuerpos pueden neutralizar a los virus por diferentes mecanismos. Pueden inhibir de modo estereoquímico la combinación con el sitio del receptor sobre las células, lo cual, en consecuencia, impide la penetración y la posterior multiplicación intracelular; el efecto protector de los anticuerpos contra la hemaglutinina del virus de la gripe proporciona un buen ejemplo. De manera similar, los anticuerpos contra la hemaglutinina del virus del sarampión impiden la entrada en la célula, pero la forma de diseminación del virus de una célula a otra es detenida por los anticuerpos contra el antígeno de fusión. Los anticuerpos pueden destruir una partícula viral libre directamente a través de la activación de la vía clásica del complemento o al producir la agregación, estimular la fagocitosis y activar la muerte intracelular por los mecanismos ya analizados. En lo que respecta a los efectos mediados por anticuerpos, las células infectadas necesitarán de la CCDA como fue comunicado en las células diana infectadas por los virus del herpes, de la vacuna y la parotiditis.

La protección mejor definida por anticuerpos se observa en enfermedades con períodos de incubación prolongados en los que el virus debe transitar por la circulación sanguínea antes de alcanzar el tejido al que por último infecta. Por ejemplo, en la poliomielitis, el virus ingresa en el organismo huésped por el tubo digestivo y con posterioridad pasa a la circulación para alojarse en las neuronas que infecta. Dentro de la sangre, el virus es neutralizado por concentraciones bastante bajas de anticuerpos específicos, mientras que el período prolongado antes de que infecte las neuronas del sistema nervioso central da tiempo para que se desarrolle una respuesta inmunitaria secundaria en el huésped ya expuesto al virus.

Factores locales

Con otras enfermedades virales, como la gripe y el resfriado común, hay un corto período de incubación en relación con el hecho de que el órgano diana terminal es el mismo que el de la puerta de entrada. Hay poco tiempo para que se monte una respuesta primaria de anticuerpos y es probable que la **producción rápida de interferón** sea el mecanismo más importante para contrarrestar la infección viral. Los estudios experimentales indican con certeza que, después de un aumento temprano en la producción del interferón, existe una disminución rápida en el título de virus viables en los pulmones de ratones infectados con el virus de la gripe (Figura 12.20). Los anticuerpos, evaluados por el título sérico, parecen arribar demasiado tarde a la escena para resultar de valor en la ayuda de la recuperación. Sin embargo, las concentraciones de anticuerpos pueden estar elevadas en los líquidos locales que bañan las superficies infectadas, por ejemplo, la mucosa nasal y los pulmones, a pesar de los títulos séricos bajos, y es la producción de **anticuerpos antivirales** (sobre todo de IgA) elaborados por las células inducidas inmunológicamente el factor de mayor importancia para la **prevención de una infección posterior**. Sin embargo, en lo que al resfriado común atañe, la infección subsiguiente suele involucrar a un virus no relacionado desde el punto de vista antigénico, de modo que es difícil lograr una inmunidad general para los resfriados.

La inmunidad mediada por células puede llegar hasta el virus intracelular

Los anticuerpos son incapaces de acceder al citosol celular. Por consiguiente, es necesaria la IMC para hacer frente a los virus latentes que están dentro de la célula huésped (Figura 12.21). La importancia de la IMC para la recuperación de la infección con estos agentes es destacada por la incapacidad de los niños con inmunodeficiencia primaria de células T de combatir a estos virus, en tanto que los pacientes con deficiencia de Ig pero IMC intacta no son afectados de este modo.

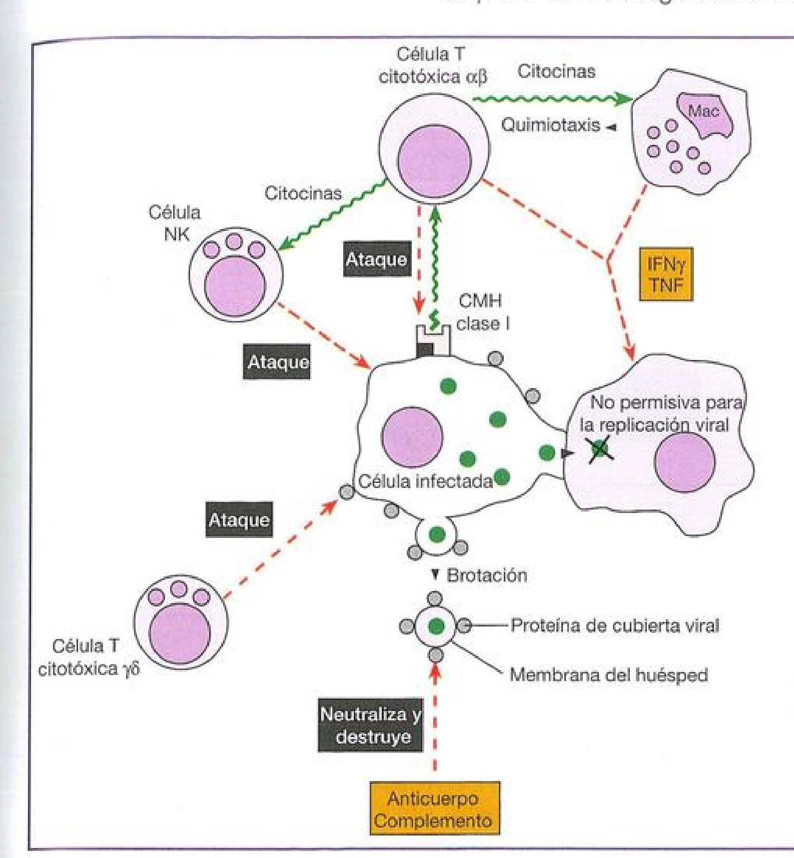


Figura 12.21. Control de la infección por virus con envoltura.

Los virus liberados por brotación desde la superficie celular son neutralizados por los anticuerpos. Las células T citotóxicas específicas destruyen directamente a las células diana infectadas por virus y pueden liberar citocinas que atraen a los macrófagos (Mac), actúan como cebado de las células contiguas para que se hagan resistentes a la infección viral (IFNγ y TNF) y activan a las células NK citotóxicas. Las células NK pueden reconocer la falta de moléculas de clase I del CMH en la membrana de la célula infectada en el caso de virus que causan inhibición de la expresión de moléculas de clase I o participar en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (CCDA) si el anticuerpo contra las proteínas de la cubierta viral está unido a la célula infectada. Incluidos en este grupo de virus que se liberan por brotación se encuentran: oncornavirus (virus oncogénicos con RNA, p. ej., virus de la leucemia murina), orthomyxovirus (influenza), paramyxovirus (parotiditis, sarampión), togavirus (dengue), rhabdovirus (rabia), arenavirus (coriomeningitis linfocítica), adenovirus, herpesvirus (herpes simple, varicela-zóster, citomegalovirus, Epstein-Barr, enfermedad de Marek), poxvirus (vacuna), papovavirus (SV40, polioma) y virus de la rubéola.

Las células NK pueden destruir las células diana infectadas por virus

El reconocimiento temprano y la destrucción de una célula infectada por un virus antes de la replicación son de beneficio evidente para el huésped. La importancia de la célula NK en esta función como agente de la inmunidad innata preformada puede analizarse a partir de observaciones en los pacientes extremadamente ocasionales con ausencia completa de estas células, quienes padecen infecciones virales recurrentes potencialmente mortales, como EBV, varicela y citomegalovirus (CMV). La célula NK tiene dos familias de receptores de superficie. Una de ellas comprende los receptores activadores de la destrucción, que se unen a los hidratos de carbono y otras estructuras expresadas en conjunto por todas las células; a la otra familia pertenecen los receptores inhibidores de la destrucción que reconocen las moléculas de clase I del CMH y anulan la señal del receptor activador. De este modo, los tejidos sobreviven a la inspección de las células NK para la ausencia de lo propio, como lo indica la expresión aberrante o ausente de las moléculas de clase I del CMH, que se produce en ciertas infecciones virales y en algunas células tumorales. La formación de IFNα durante la infección viral no sólo protege las células circundantes, sino que también activa las células NK.

Las células T citotóxicas son elementos cruciales en la inmunidad contra los virus

Los linfocitos T de un huésped sensibilizado son directamente citotóxicos para las células infectadas por virus, y los nuevos antígenos peptídicos asociados al CMH sobre la superficie de la célula diana son reconocidos por receptores αβ específicos sobre los linfocitos T citotóxicos (denominados LTC o Tc). Existe una frecuencia bastante sorprendente de especificidades duales en el reconocimiento de la célula diana por los clones de Tc específicos para el virus, que pueden lisar células alogénicas o células diana no infectadas que expresan péptidos con poca homología de las regiones diferentes de la misma proteína viral, de distintas proteínas del mismo virus o incluso de virus no relacionados. De ahí que la activación por un segundo virus puede contribuir a mantener la memoria, y puede haber una inmunidad espontánea frente a un virus no relacionado después de la infección inicial con una cepa que reacciona en forma cruzada. La inhibición de la molécula de clase I del CMH no plantea problema alguno para las células T con receptores γδ ya que éstas reconocen la proteína de la cubierta viral nativa (p. ej., glucoproteína del virus del herpes simple) sobre la superficie celular (Figura 12.21).

Después de una infección natural, se generan anticuerpos y LTC. La protección posterior perdura durante mucho tiempo sin reinfección y es posible que sea reforzada por la activación concurrente a través de citocinas liberadas por otras células T estimuladas, o quizá por la estimulación al azar con virus no relacionados sobre la base de la especificidad dual descrita antes. Por el contrario, la inoculación de virus de la gripe muertos produce anticuerpos pero no Tc, y la protección es sólo de corto plazo.

Las citocinas reclutan efectores y proporcionan un "cordón sanitario"

Los estudios sobre la transferencia de la protección contra infecciones por virus de la gripe, coriomeningitis linfocítica,

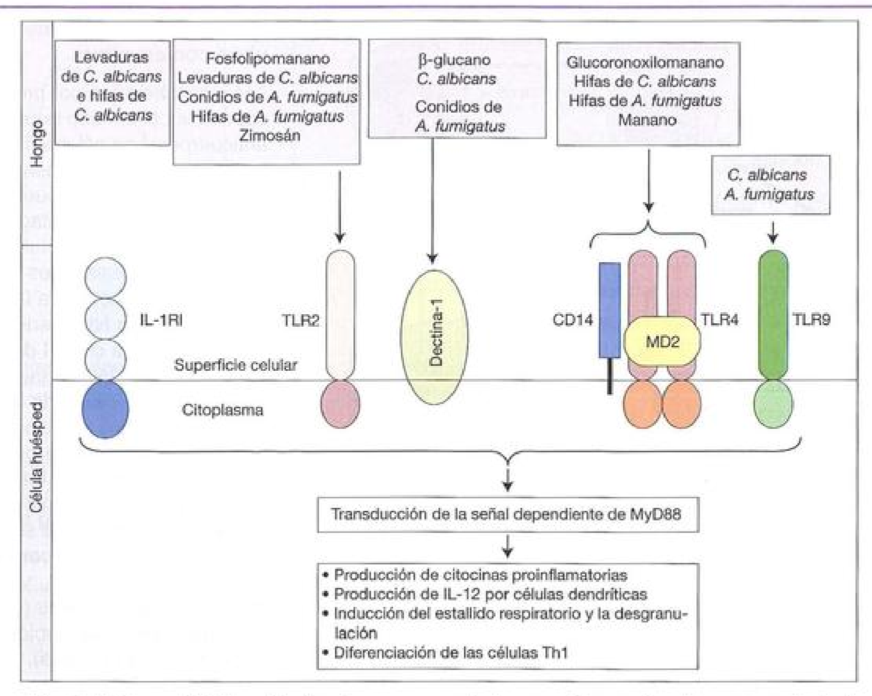


Figure 12.22. Activación de la inmunidad contra los hongos mediada por el receptor de reconocimiento de patrón (PRR).

Diferentes patrones moleculares asociados con patógenos presentes sobre las paredes celulares de los hongos pueden activar la respuesta inmunitaria tanto innata como adaptativa a través de la vía canónica MyD88 tras su reconocimiento por los PRR sobre las células huésped. IL-1 RI, receptor de interleucina-1 de tipo I; TLR, receptor de tipo Toll; zimosán, suspensión de levaduras. (Modificado de Romani L. [2004] *Nature Reviews Immunology* **4**, 1-23, con autorización de los editores.) *A. fumigatus, Aspergillus fumigatus; C. albicans, Candida albicans.*

vacuna, ectromelia y CMV indicaron que las células T CD8 en lugar de las CD4 constituyen la principal fuerza defensiva. La respuesta refleja sería implicar a la citotoxicidad, pero debe recordarse que las células CD8 también producen citocinas. Esto bien puede ser crucial cuando los virus eluden el mecanismo citotóxico y logran deslizarse lateralmente hacia una célula adyacente. La IMC puede ahora jugar algunas cartas nuevas: si las células T estimuladas por el antígeno viral liberan citocinas como IFNγ y quimiocinas de macrófagos o monocitos, los fagocitos mononucleares atraídos al sitio serán activados para secretar TNF, que de manera sinérgica con el IFNγ mantendrán a las células contiguas no permisivas para la replicación de cualquier virus adquirido por transferencia intercelular (Figura 12.21). De esta manera, el sitio de infección puede ser circundado por un cordón de células resistentes. Como sucede con el IFNα, el IFNγ aumenta la citotoxicidad inespecífica de las células NK para las células infectadas. Esta generación de "interferón inmune" (IFNγ) y TNF como respuesta a los componentes virales diferentes de los ácidos nucleicos proporciona un valioso mecanismo de reserva cuando se trata de virus que son intrínsecamente estimuladores deficientes de la síntesis de interferón del tipo I (IFNα e IFNβ).

Inmunidad contra los hongos

Las infecciones micóticas oportunistas se establecen con frecuencia en huéspedes inmunocomprometidos o cuando se altera el equilibrio de la flora comensal normal por la administración de antibióticos de amplio espectro durante períodos prolongados. La fagocitosis, en especial tras la activación de los macrófagos con la mediación de las células Th1 por el IFNγ y el TNF, desempeña un papel fundamental en el enfrentamiento de las infecciones micóticas. Sin embargo, como ya se señaló para ciertas bacterias, algunos hongos (p. ej., *Histoplasma capsulatum*) pueden residir alegremente en los macrófagos. Las especies reactivas del oxígeno son fungicidas para la mayoría de las especies porque inducen modificaciones en las proteínas, dañan el ácido nucleico y causan peroxidación de los lípidos. El contraataque de los hongos incluye la inhibición del estallido respiratorio por la catalasa, el manitol y la melanina. Tras la inhalación de *Aspergillus fumigatus,* los macrófagos alveolares fagocitan y destruyen los conidios (esporas), si bien las proteasas de los hongos pueden colaborar en la protección de las esporas de estas actividades. En los pulmones, los conidios pueden germinar en hifas ramificadas, que probablemente se relacionan con la liberación de gránulos oxidantes y fungicidas a partir de los neutrófilos.

Se demostró que las células NK tienen actividad antimicótica constitutiva, por ejemplo, contra *Cryptococcus neoformans,* en tanto que esta actividad contra el microorganismo necesita ser inducida en los LTC. En el caso de *A. fumigatus,* la respuesta inmunitaria adaptativa es activada tras la captación de los conidios y las hifas por las células dendríticas locales y la presentación ulterior a las células T en los ganglios linfáticos que drenan la región. Los componentes de la pared celular de los hongos pueden enviar señales a las

Parásitos causales	Enfermedad	Millones de personas infectadas (escala logarítmica)
Protozoos		
Plasmodium vivax, *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae*	Paludismo	400
Leishmania tropica, *L. donovani*, *L. braziliensis*	Leishmaniasis	12
Tryponosoma cruzi	Enfermedad de Chagas	17
T. rhodesiense, *T. gambiense*	Enfermedad del sueño	0.4
Helmintos		
Trematodos		
Schistosoma mansoni, *S. haematobium*, *S. japonicum*	Esquistosomiasis	200
Nematodos (gusanos)		
Trichinella spiralis	Triquinosis	27
Stronglyoides duodenale, *Necator americanus*	Uncinariasis	96
Wuchereria bancrofti, *Onchocerca volvulus, etc.*	Filariasis	120

Escala: 0, 1, 10, 100, 1000 — Millones de personas infectadas (escala logarítmica)

Figura 12.23. Algunos de los principales parásitos en los seres humanos y el enorme número de personas infectadas.

(Datos de la Organización Mundial de la Salud, www.who.int)

células dendríticas a través de varios receptores de reconocimiento de patrón (Figura 12.22), y ello da lugar a la liberación de IL-12, que impulsa una respuesta Th1. El papel de los anticuerpos es complejo y no siempre ventajoso, aunque hay ejemplos claros de los efectos protectores, como los anticuerpos contra la proteína del choque térmico 90 (hsp90) de *Candida albicans*, que protegen contra la enfermedad diseminada en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida. La proteína de unión a la manosa puede aglutinar a *Candida albicans* y, con posterioridad, activar el sistema del complemento.

La producción de fosfolipasas, proteasas y elastasas por los hongos actúa como factor de virulencia. Los hongos dimorfos, como *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum* se transforman de hongos filamentosos en levaduras unicelulares, mientras que algunas especies de *Candida*, como *Candida albicans*, pueden adquirir la forma de levaduras, blastosporas, pseudohifas o hifas según el sitio de infección. Se presume que los cambios antigénicos que acompañan a estos cambios morfológicos actúan como factores de virulencia. También se cree que las adhesinas presentes en la superficie de los hongos también actúan como factores de virulencia puesto que su neutralización por fragmentos de la región variable de los anticuerpos puede bloquear la infección en un modelo animal de candidiasis vaginal.

Inmunidad contra las infecciones parasitarias



En la Figura 12.23 se mencionan los diversos organismos que causan las principales enfermedades parasitarias. La cantidad de personas afectadas es por cierto alarmante y el sufrimiento que aquellas causan es demasiado grande para comprenderlo. Las consecuencias del parasitismo podrían ser, en un extremo del espectro, la falta de respuesta inmunitaria que conduce a la sobreinfección abrumadora, y, en el otro extremo, una respuesta inmunopatológica exagerada potencialmente mortal. Para lograr su objetivo, el parásito debe cumplir un ciclo entre esos extremos para evitar la muerte del huésped humano, y al mismo tiempo, escapar de la destrucción por el sistema inmunitario.

Figura 12.24. Importancia relativa de las respuestas de anticuerpos y mediadas por células en las infecciones por protozoos.

Parásito	*Trypanosoma brucei*	*Plasmodium*	*Trypanosoma cruzi*	*Leishmania*
Hábitat	Libre en la sangre	Dentro del eritrocito o del hepatocito	Dentro del macrófago	Dentro del macrófago
Anticuerpos				
Importancia	++++	+++	++	+
Mecanismo	Lisis con complemento Opsoniza para la fagocitosis	Bloquea la invasión Opsoniza para la fagocitosis	Limita la diseminación en la infección aguda	Limita la diseminación
Medios de evasión	Variación antigénica	Hábitat intracelular Variación antigénica	Hábitat intracelular	Hábitat intracelular
Mediada por células				
Importancia	–	+	+++ (fase crónica)	++++
Mecanismo	–	Activación de los macrófagos mediada por citocinas para el estadio eritrocítico. LTC para el estadio hepático	Activación de macrófagos mediante citocinas y destrucción por TNF, metabolitos del O_2 y NO· Función para las células T citotóxicas	

Las respuestas del huésped

El huésped despliega una amplia variedad de mecanismos defensivos, pero de manera muy general puede decirse que se desarrolla una respuesta humoral cuando los microorganismos invaden la circulación sanguínea (paludismo, tripanosomiasis), mientras que los parásitos que desarrollan dentro de los tejidos (p. ej., leishmaniasis cutánea) suelen desencadenar una IMC (Figura 12.24). A menudo, el huésped con infección crónica es resistente a la reinfección con microorganismos nuevos, situación denominada **inmunidad concomitante.** Esto se observa sobre todo en la esquistosomiasis, como también en el paludismo. Las formas residentes e infectantes deben diferir de alguna manera que aún debe ser determinada con precisión.

Figura 12.25. Microfotografía electrónica que muestra un eosinófilo (Eo) adherido a la superficie de una esquistosómula (Es) en presencia de anticuerpos específicos.

La célula desarrolla grandes vacuolas (V) que parecen liberar su contenido sobre el parásito (×16.500). (Cortesía de McLaren D.J. y Mackenzie C.D.)

Inmunidad humoral

Los anticuerpos con especificidad correcta presentes en concentraciones y afinidad adecuadas son bastante eficaces para proporcionar protección contra los parásitos transportados por la sangre, como *Trypanosoma brucei* y los estadios de esporozoíto y merozoíto del paludismo. Así, los individuos que reciben IgG proveniente de adultos con inmunidad sólida en áreas endémicas de paludismo están protegidos transitoriamente contra la infección, y los mecanismos efectores son la opsonización y la fagocitosis, y la lisis dependiente del complemento.

Una característica destacada de la reacción inmunitaria contra las infecciones helmínticas, como *Trichinella spiralis* en los seres humanos y *Nippostrongylus brasiliensis* en la rata, es la eosinofilia y la concentración elevada de anticuerpos IgE producidos. En los seres humanos, las concentraciones séricas de IgE pueden elevarse de los valores normales de alrededor de 100 ng/mL a cifras tan altas como 10.000 ng/mL. Estos cambios tienen todas las características distintivas de una respuesta a las citocinas de tipo Th2 y es notable que en los animales infectados con helmintos la inyección de anti-IL-4 reduzca en gran medida la producción de IgE y la de anti-IL-5 suprima la eosinofilia. La IL-13 en la piel, que junto con la IL-4 es un factor de cambio para la producción

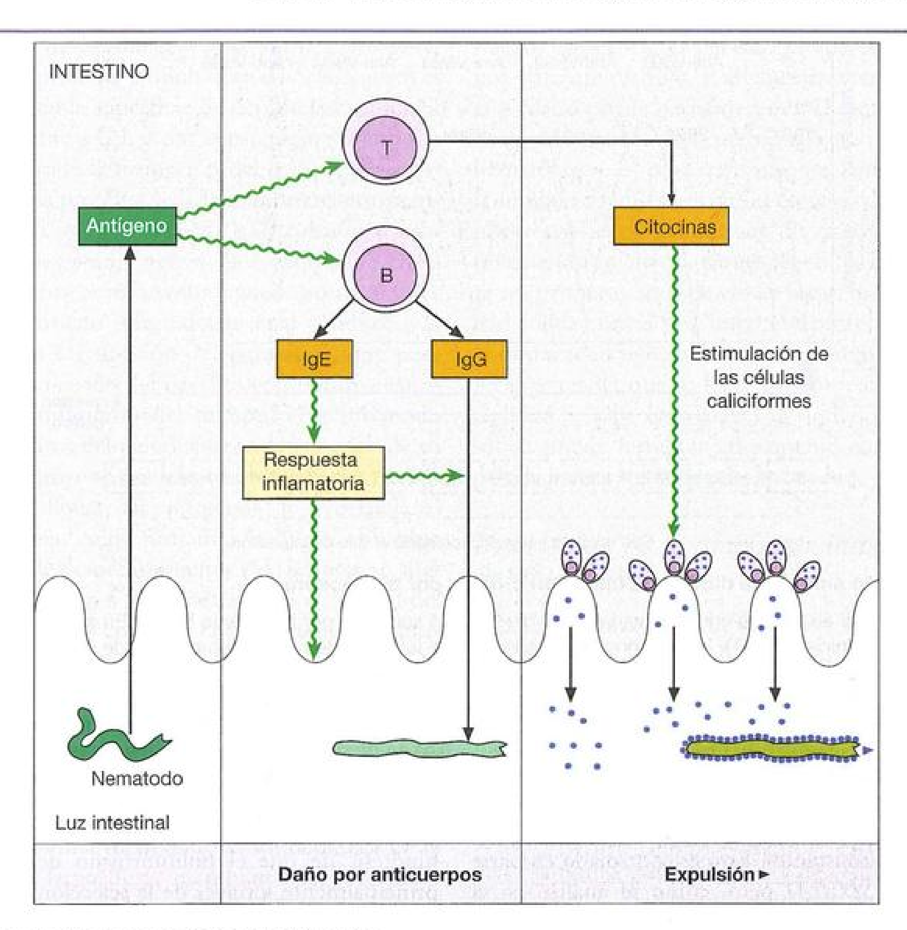


Figura 12.26. Expulsión de nematodos del intestino.

El parásito es dañado primero por los anticuerpos IgG que pasan al interior de la luz intestinal, quizá como consecuencia de la inflamación mediada por la IgE y tal vez ayudada por las células accesorias que intervienen en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). Las citocinas, como IL-4, IL-13 y TNF, liberadas por las células T activadas específicamente por el antígeno estimulan la proliferación de células caliciformes y la secreción de moco que recubren al parásito dañado y facilitan su expulsión del organismo huésped por el aumento de la motilidad intestinal inducida por los mediadores de los mastocitos, como el leucotrieno-D4, y la diarrea secundaria a la inhibición de la absorción de sodio dependiente de la glucosa por la histamina y la PGE_2 derivadas de los mastocitos.

de IgE, parece desempeñar una función importante en la protección contra los esquistosomas. La estimulación específica por el antígeno de los mastocitos recubiertos con IgE conduce a la exudación de proteínas séricas que contienen concentraciones elevadas de anticuerpos protectores en todas las clases principales de Ig y la liberación de factor quimiotáctico de los eosinófilos. La IgE puede facilitar la CCDA hacia las esquistosómulas, las formas inmaduras tempranas del esquistosoma, y esto puede estar mediado por eosinófilos, monocitos, macrófagos y plaquetas. Las esquistosómulas también pueden ser destruidas por eosinófilos que utilizan IgG para la unión de la CCDA a través de sus receptores FcγRII al parásito recubierto por IgG (Figura 12.25); la principal proteína básica de los gránulos eosinófilos es liberada sobre el parásito y provoca su destrucción. Asimismo, puede haber un requerimiento localizado para las células Th1 dado que se demostró que el IFNγ en el hígado es importante en la inmunidad contra los esquistosomas. Deben mencionarse dos puntos adicionales: las reacciones mediadas por IgE pueden ser vitales para la recuperación de la infección, mientras que la resistencia en los huéspedes vacunados puede depender más de los anticuerpos IgG e IgA preformados.

Inmunidad mediada por células

Al igual de los que sucede con ciertas bacterias y hongos, algunos parásitos se adaptaron a la vida dentro del macrófago a pesar de los potentes mecanismos microbicidas que tiene esta célula, entre los que se halla el NO·. Los microorganismos intracelulares, como *Toxoplasma gondii, Trypanosoma cruzi* y las especies de *Leishmania*, utilizan una variedad de tácticas para alterar los sistemas de destrucción de los macrófagos (véase más adelante), pero de nuevo, como sucede en las infecciones por micobacterias, las células T productoras de citocinas desempeñan una función crucial en la estimulación de los macrófagos el desplegar su poder de destrucción y eliminar a los intrusos no deseados.

El equilibrio de las citocinas producidas es de suma importancia. La infección de ratones por *Leishmania major* sirve como ejemplo en este aspecto; el microorganismo causa una enfermedad mortal en ratones susceptibles, si

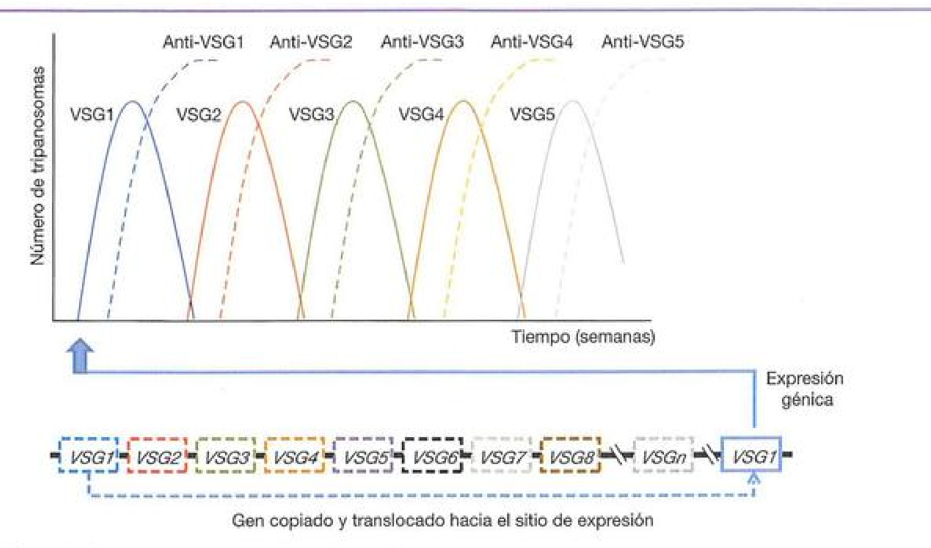


Figura 12.27. Variación antigénica durante la infección crónica por tripanosoma.

A medida que se forma el anticuerpo contra la variante de glucoproteína de superficie inicial (VSG1), los tripanosomas sanguíneos se recubren antes de la fagocitosis y dejan de ser infectantes, con lo cual queda un número pequeño de parásitos viables que han adquirido una nueva constitución antigénica. Esta nueva variante (VSG2) ahora se multiplica hasta que, también, es neutralizada por la respuesta primaria de anticuerpos y es sucedida por la variante VSG3. En algún momento, sólo una de las variantes de glucoproteínas de superficie (VSG) se expresa y cubre la superficie del protozoo para la exclusión de todos los otros antígenos. Casi el 9% del genoma (alrededor de 1.000 genes) está dedicado a la generación de VSG. Los cambios se producen por la inserción de un gen duplicado en una nueva localización genómica en la proximidad del promotor.

bien otras cepas son resistentes. Esto es controlado en parte por alelos del gen *SLCIIA1* pero, como se analizó en el Capítulo 9, en los ratones susceptibles hay una estimulación excesiva de células Th2 productoras de IL-4 que no ayuda a eliminar la infección, mientras que las cepas resistentes están caracterizadas por la expansión de células Th1 que secretan IFNγ en respuesta al antígeno presentado por los macrófagos que albergan protozoos *viables*. La terapéutica combinada de cepas susceptibles con un fármaco leishmanicida, como Pentostam, más IL-12, que recluta las células Th1, parece ser promisoria porque pueda cambiar la actividad de Th2, que exacerba la enfermedad, a respuestas de Th1 protectoras. Ciertos microorganismos, como los plasmodios del paludismo y en ocasiones las rickettsias y las clamidias, que viven en células que no son fagocitos profesionales, pueden ser eliminados a través de la activación de mecanismos de defensa intracelular. Sin embargo, la inducción de IFNγ y de células T CD8+ es de particular importancia para la protección. También se requieren la interleucina-12 y el óxido nítrico, y las células NK pueden desempeñar una función secundaria mediante la producción adicional de IFNγ. La citotoxicidad directa por las células T CD8+ puede participar en los hepatocitos que albergan esporozoítos del paludismo. Es pertinente mencionar que, tras el reconocimiento de una asociación entre HLA-B53 y la protección contra el paludismo grave, se demostró en la sangre periférica de individuos resistentes LTC restringidos por B53 que reaccionan con un nonámero conservado proveniente de un antígeno específico del estadio hepático. Un estudio numeroso con control de casos de paludismo en niños de Gambia puso de manifiesto que el antígeno de clase I B53 protector es común en los niños de África occidental, pero raro en otros grupos raciales, lo cual brinda más credibilidad a la hipótesis de que el polimorfismo del CMH evolucionó principalmente a través de la selección natural por patógenos infecciosos.

La eliminación de las infestaciones por helmintos del intestino requiere de fuerzas combinadas de la inmunidad celular y humoral para eliminar al invitado indeseable. Uno de los modelos estudiado es la respuesta a *Nippostrongylus brasiliensis*; los estudios de transferencia en ratas demostraron que, si bien los anticuerpos producen algún daño a los parásitos, también se requieren células T de donantes inmunes para la expulsión vigorosa, la que probablemente se logra a través de una combinación de la estimulación de la motilidad intestinal mediada por los mastocitos y la activación por citocinas de las innumerables células caliciformes intestinales. Éstas secretan mucinas que forma un gel viscoelástico alrededor del parásito y, en consecuencia, protege las superficies colónicas e intestinales de la invasión (Figura 12.26). Otro modelo, esta vez la infección por *Trichinella spiralis* en ratones, reforzó la importancia de la activación de las respuestas de citocinas de la subpoblación de células T más adecuada. Una cepa, que expulsa los helmintos adultos con rapidez, elabora grandes cantidades de IFNγ y anticuerpos Ig-G2a, en tanto que, por el contrario, los ratones más susceptibles elaboran cantidades mínimas de IFNγ y favorecen las clases de anticuerpos IgG1, IgA e IgE. Está claro que la estrategia protectora varía de acuerdo con la infección.

Estrategias evasivas de los parásitos

Resistencia a los mecanismos efectores

Son de interés algunas artimañas para asegurar las defensas del complemento. En forma sofisticada, *T. cruzi* ha creado una molécula similar a DAF que acelera la degradación de C3b.

La molécula SCIP1 de *Schistosoma mansoni* (*schistosome C inhibitory protein* 1; proteína 1 inhibidora de *Schistosoma*) es una forma expuesta en la superficie de la proteína muscular paramiosina que se une a C9, y por consiguiente, inhibe su polimerización e impide la formación del complejo de ataque de membrana. La proteína 1 de la membrana eritrocítica de *Plasmodium falciparum* (PfEMP1; *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1*) es expresada en la superficie de los eritrocitos infectados y puede unirse al CR1 (CD35) de otro eritrocito infectado, lo cual conduce a la formación de rosetas (agrupación de eritrocitos), que pueden facilitar la diseminación del parásito con mínima exposición al sistema inmunitario del huésped. De un modo similar, los esporozoítos del paludismo se desprenden de su antígeno circumesporozoíto cuando se une al anticuerpo, y *Trypanosoma brucei* libera sus antígenos de superficie al medio para que actúen como proteínas "señuelo". En cada caso, estos sistemas de desprendimiento y de señuelo se adecuan bien a los parásitos o a los estadios en el ciclo vital del parásito que sólo están en contacto con el sistema inmunitario por un breve período.

Los protozoos parásitos que se ocultan de los efectos de los anticuerpos utilizando el interior de un macrófago como santuario bloquean los mecanismos microbicidas normales y recurren a métodos similares a los desplegados por las bacterias intracelulares. *Toxoplasma gondii* inhibe la fusión del fagosoma con el lisosoma revistiendo la mitocondria de la célula huésped a lo largo de la membrana del fagosoma. *Trypanosoma cruzi* escapa de los confines del fagosoma en el citoplasma, mientras que los parásitos *Leishmania* están rodeados por un lipofosfoglucano que los protege del estallido oxidativo porque recoge los residuos de los radicales oxígeno. También inhiben la expresión de moléculas del CMH, CD80 y CD86, lo cual disminuye la estimulación de las células T.

El huésped puede evitar el reconocimiento del antígeno

Algunos parásitos se **disfrazan** para parecerse al huésped. Esto puede conseguirse por imitación molecular, como se demuestra por la reactividad cruzada entre los antígenos de *Ascaris* y el colágeno humano. Otra manera es cubrir la superficie con proteínas del huésped. Los esquistosomas son muy buenos en este aspecto; el helminto adulto capta las glucoproteínas del eritrocito, las moléculas del CMH y la IgG, y vive feliz en los vasos mesentéricos del huésped, a pesar de que la sangre que lo baña contiene anticuerpos que pueden impedir la reinfección.

Otra artimaña muy hábil, bastante similar a lo que en el fútbol sería mover la posición de los arcos, es la **variación antigénica**, en la que los parásitos escapan de la acción citocídica de los anticuerpos humorales en las formas sanguíneas de su ciclo por el ingenioso ardid de alterar su constitución antigénica. En la Figura 12.27 se ilustra cómo el tripanosoma se mantiene infectivo para el huésped, incluso después de la aparición de los anticuerpos completamente protectores, mediante el cambio de la expresión de una nueva variante antigénica que estos anticuerpos no pueden inactivar; a medida que se sintetizan los anticuerpos contra los nuevos antígenos, el parásito escapa otra vez cambiando a una variante distinta, y así sucesivamente. De esta manera, el parásito puede permanecer en la circulación sanguínea el tiempo requerido para permitir la transmisión por insectos hematófagos o por transfusiones sanguíneas. El mismo fenómeno se observó con las especies de *Plasmodium* y esto puede explicarse porque, en las áreas hiperendémicas, los niños están sujetos a ataques repetidos de paludismo durante sus primeros años de vida y luego presentan una inmunidad sólida contra una infección posterior. Es probable que la inmunidad se desarrolle contra todas las variantes antigénicas antes de que se logre una protección completa, y en realidad se sabe que la IgG de individuos con inmunidad sólida puede terminar eficazmente con las infecciones de paludismo en los niños de corta edad.

Desviación de la respuesta inmunitaria del huésped

En la mayoría de las infecciones parasitarias estudiadas, se encontró inmunosupresión. Durante la infección por tripanosomas, por ejemplo, hay una activación policlonal de respuestas de células T y B, que desvía la respuesta inmunitaria de la producción de anticuerpos específicos. Se identificó una prolina racemasa (enzima que cataliza la interconversión de las formas L y D de prolina) secretada por *T. cruzi* como mitógeno de las células B. Los parásitos también pueden manipular subpoblaciones de células T para su propio beneficio. La filariasis proporciona un ejemplo: se sugirió que los individuos con microfilarias persistentes son incapaces de montar respuestas de hipersensibilidad inmediata presumiblemente protectoras, como IgE y eosinofilia, a causa de la supresión activa de células Th2.

Los estudios epidemiológicos coinciden en el papel protector de los anticuerpos IgE en la esquistosomiasis, pero también revelan una población susceptible que produce anticuerpos IgM e IgG4 susceptibles de bloquear la CCDA dependiente de IgE. La capacidad de ciertos helmintos de activar de manera policlonal las células B productoras de IgE es buena para el parásito pero no tanto para el huésped, ya que una concentración elevada de IgE irrelevante unida a un mastocito desplazara las moléculas de IgE específicas del parásito y disminuirá la posibilidad de estimular los mastocitos para iniciar una reacción defensiva protectora.

Encefalopatías espongiformes transmisibles

La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob variante (vECJ) se describió por primera vez en 1996 y, con la "tembladera de las ovejas" (el *scrapie* de los autores sajones) y la encefalopatía espongiforme bovina, se clasifica como una encefalopatía espongiforme transmisible causada por priones. El prion de la encefalopatía espongiforme bovina, causante de la "enfermedad de la vaca loca", se adquiere cuando los seres humanos consumen carne de vacunos alimentados con restos de animales afectados. Esta enfermedad causó mucha alarma, en especial en el epicentro de la infección, en Gran Bretaña, debido a la naturaleza impredecible de la "epidemia". Sin embargo, a comienzos de 2006, el número de muertes en el Reino Unido por vECJ permanecía en 155 y es probable que

la enorme mortalidad que predijo en un comienzo algún modelo matemático no suceda en la realidad.

En las encefalopatías espongiformes transmisibles, la proteína del prion celular no patógena normal (PrPc), de función desconocida, adquiere un plegamiento anómalo que causa la formación de agregados patógenos relativamente resistentes a la proteasa conocidos como PrPsc (proteína de la tembladera de las ovejas). Lamentablemente, el papel del sistema inmunitario en las enfermedades por priones parece contribuir a la enfermedad más que a combatirla. La infectividad por lo común alcanza a altos niveles en los tejidos linfoides antes de diseminarse al sistema nervioso central, y las células dendríticas foliculares del bazo, los ganglios linfáticos y las placas de Peyer pueden participar en esta replicación, tal vez porque expresan naturalmente altos niveles de PrPc, que luego se convierte en PrPsc tras la exposición al agente de la encefalopatía espongiforme transmisible. Los linfocitos B pueden desempeñar una función contributiva a través de la producción de TNF y linfotoxina, citocinas necesarias para la formación de redes de células dendríticas foliculares en los tejidos linfoides secundarios; la linfotoxina es requerida, además, para el mantenimiento de un estado diferenciado en estas células. Asimismo, además de las células dendríticas foliculares, los macrófagos y las células dendríticas pueden proporcionar un reservorio para la infectividad. Una vez que los priones infecciosos ingresan en el sistema nervioso central, causan la activación y la proliferación de las células de la microglía, los macrófagos del cerebro. A pesar de que las células T infiltran el sistema nervioso, las pruebas disponibles provenientes de ratones con desactivación génica sugieren que, una vez que el prion alcanza el cerebro, la progresión ulterior de la enfermedad es independiente de las células T y B, el interferón, el TNF, la linfotoxina, los FcγR, los TLR y el complemento.

Inmunopatología

Cuando los parásitos persisten crónicamente a pesar de la respuesta inmunitaria, la interacción con el antígeno extraño suele producir reacciones tisulares perjudiciales. Un ejemplo es el síndrome nefrótico inducido por inmunocomplejos de los niños de Nigeria asociado con la fiebre cuartana causada por *Plasmodium malariae* que, de manera característica, presenta un patrón de escalofríos y fiebre de 72 horas relacionado con el ciclo vital del parásito. Los niveles aumentados de TNF son los que determinan los cambios pulmonares en el paludismo agudo, el paludismo cerebral en los ratones y la consunción intensa de los bovinos con tripanosomiasis. Otro ejemplo es el daño hepático resultante de la formación de granulomas mediada por IL-4 alrededor de los huevos de esquistosoma (véase la Figura 15.28); uno de los antígenos del huevo induce la producción directa de IL-10 en las células B, lo cual contribuye al predominio de Th2. Es de destacar que la reacción de hipersensibilidad ayuda a que los huevos escapen desde los capilares sanguíneos intestinales hacia la luz del intestino para continuar el ciclo fuera del organismo huésped, un efecto mediado por el TNF.

La reacción cruzada entre el parásito y lo propio puede dar lugar a la autoinmunidad, y esto se ha propuesto como la base para la miocardiopatía en la enfermedad de Chagas. También es pertinente que la inmunosupresión inespecífica que favorece las enfermedades parasitarias diseminadas tiende a aumentar la susceptibilidad a las infecciones bacterianas y virales, y en este contexto, la asociación entre el linfoma de Burkitt y el paludismo se ha atribuido a una respuesta inadecuada del huésped frente al virus de Epstein-Barr.

RESUMEN

La inmunidad contra la infección significa una batalla constante entre las defensas del huésped y los microbios mutantes que tratan de desarrollar estrategias de evasión.

Revisión de la inflamación

- La inflamación es una reacción defensiva fundamental iniciada por la infección o por la lesión tisular.
- Los mediadores liberados inducen la sobreexpresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales y los leucocitos, y causan primero el rodamiento de los leucocitos a lo largo de la pared endotelial; después, atraviesan el vaso sanguíneo a favor del gradiente quimiotáctico hacia el sitio de inflamación.
- La IL-1, el TNF y las quimiocinas como IL-8 participan en el mantenimiento del proceso inflamatorio.
- La inflamación es controlada por las proteínas reguladoras del complemento, la PGE_2, el TGFβ, los glucocorticoides y la IL-10.
- La incapacidad de eliminar el agente iniciador conduce a una respuesta inflamatoria crónica dominada por macrófagos con la formación frecuente de granulomas.

Las bacterias extracelulares son susceptibles de ser destruidas por fagocitosis y complemento

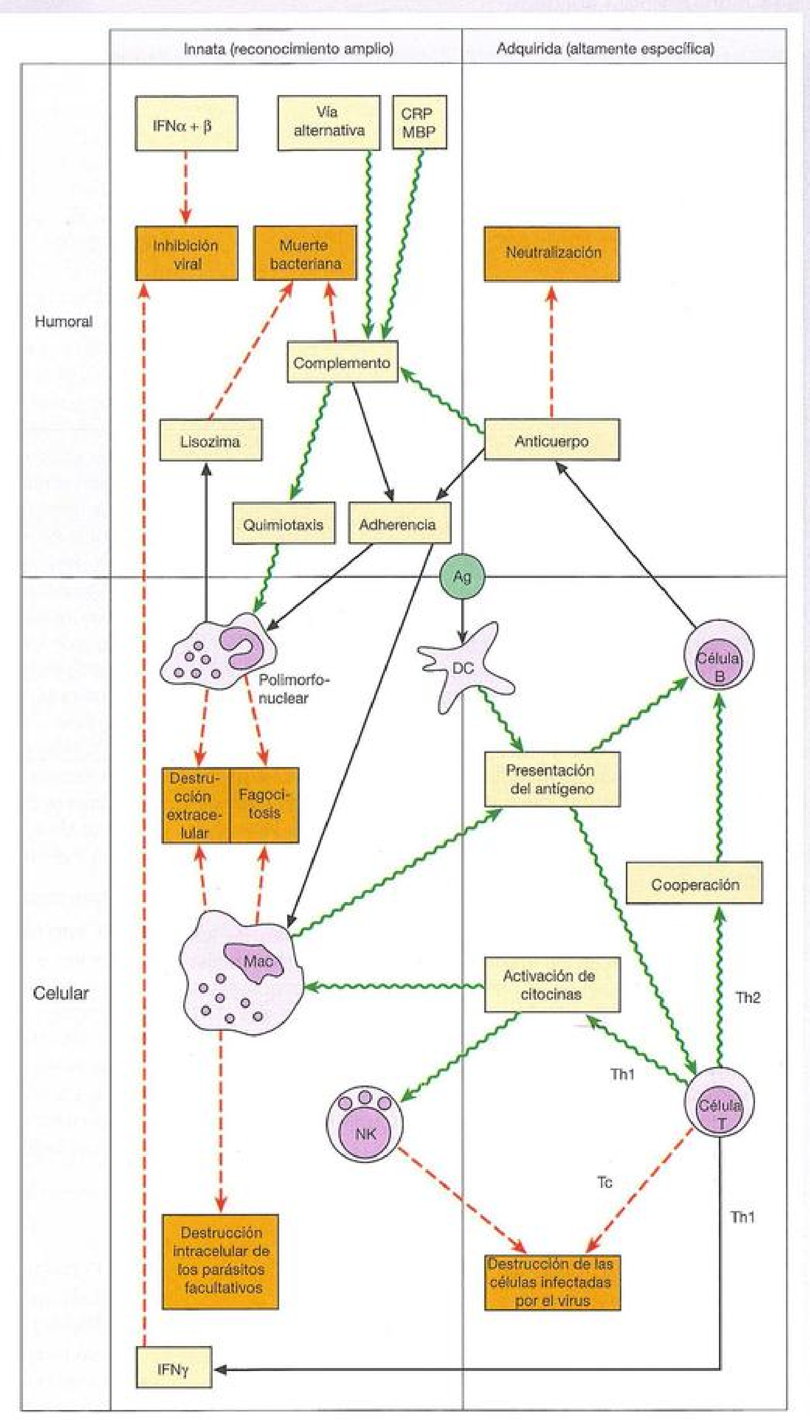
- El LPS está unido por la LBP (proteína de unión al LPS), que lo transfiere al complejo CD14-TLR4, y en consecuencia activa los genes en la célula presentadora de antígeno que codifica las citocinas proinflamatorias.
- Las bacterias intentan evitar la fagocitosis al rodearse de cápsulas, por la secreción de exotoxinas que destruyen los fagocitos o impiden las reacciones inflamatorias, desviando el complemento a sitios inofensivos o colonizando sitios relativamente inaccesibles.
- Los anticuerpos combaten estas estratagemas mediante la neutralización de toxinas, facilitando las lesiones mediadas por el complemento sobre la superficie bacteriana y superando la naturaleza antifagocítica de las cápsulas por la opsonización de éstas con Ig y C3b.
- El sistema inmunitario secretor protege las superficies mucosas externas. La IgA inhibe la adherencia de las bacterias y puede opsonizarlas. La IgE unida a los mastocitos puede iniciar la afluencia de IgG protectora, complemento y neutrófilos.

Bacterias que crecen en un hábitat intracelular

- Las bacterias intracelulares, como los bacilos de la tuberculosis y de la lepra, crecen dentro de los macrófagos. Desafían los mecanismos de destrucción mediante el bloqueo de la activación del macrófago, la neutralización del pH en el fagosoma, la inhibición de la fusión del lisosoma y el escape desde el fagosoma hacia el interior del citoplasma.
- Las bacterias son destruidas por la IMC: las células T *helper* liberan citocinas cuando entran en contacto con los macrófagos infectados que activan de manera poderosa la

Figura 12.28. Esquema simplificado para destacar las interacciones entre los mecanismos de la inmunidad innata y adquirida.

La célula dendrítica que presenta el antígeno a las células B en la forma de inmunocomplejos es la célula dendrítica folicular en los centros germinativos, mientras que la célula dendrítica interdigitada positiva para moléculas de clase II del CMH presenta el antígeno a las células T. CRP, proteína C reactiva; MBL, lectina de unión a la manosa. (Desarrollado a partir de Playfair J.H.L. [1974] *British Medical Bulletin* **30**, 24.)



formación de óxido nítrico (NO·), especies reactivas del oxígeno y otros mecanismos microbicidas.

Inmunidad contra la infección viral

- Los virus intentan eludir el sistema inmunitario por medio de cambios en la antigenicidad de sus antígenos de superficie. Las mutaciones puntuales dan lugar a la deriva antigénica, pero las variaciones radicales que conducen a endemias pueden ser el resultado del intercambio de gran cantidad de material genético con reservorios de diferentes virus en otros huéspedes animales (cambio antigénico).
- Algunos virus alteran la función del sistema complemento para su propio beneficio.
- Los virus pueden interferir casi con cualquier paso en el procesamiento y la presentación de antígeno a las células T.
- Los anticuerpos neutralizan a los virus libres y esto es particularmente efectivo cuando el virus tiene que circular con la sangre antes de alcanzar su objetivo final.
- Cuando el órgano diana terminal del virus es el mismo que el de la puerta de entrada, por ejemplo, los pulmones, el IFN es dominante en la recuperación de la infección.
- Los anticuerpos tienen importancia en la prevención de las reinfecciones.
- Los virus que salen de la célula por brotación y pueden invadir células adyacentes sin exponerse a los anticuerpos son combatidos por la IMC. Las células infectadas expresan un péptido antigénico viral procesado en su superficie en asociación con las moléculas de clase I del CMH inmediatamente después de la entrada del virus, y la destrucción rápida de la célula por las células T αβ citotóxicas previene

la multiplicación viral que depende de la maquinaria replicativa de la célula huésped intacta. La célula Tc γδ reconoce la proteína de la cubierta viral nativa en la superficie de la célula diana. Las células NK también son citotóxicas.
- Las células T y los macrófagos productores de IFNγ y TNF bañan las células contiguas e impiden que sean infectadas por diseminación lateral del virus.

Inmunidad contra los hongos

- Las infecciones micóticas oportunistas son frecuentes en el huésped inmunocomprometido.
- La fagocitosis tiene un papel central en la lucha contra la infección micótica.
- Las células CTL y NK ejercen actividades antimicóticas.
- Los anticuerpos no siempre son ventajosos, pero parecen contribuir a la protección contra las infecciones candidiásicas sistémicas en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

Inmunidad contra las infecciones parasitarias

- Las enfermedades por *protozoos* y *helmintos* afectan a cientos de millones de personas. Los anticuerpos suelen ser eficaces contra las formas transportadas por la sangre. La producción de IgE está notablemente aumentada en las infestaciones por helmintos y puede conducir a la afluencia de Ig y de eosinófilos mediada por mastocitos; los esquistosomas cubiertos con IgG o IgE son destruidos por eosinófilos adherentes a través de mecanismos extracelulares que comprenden la liberación de proteínas catiónicas y de peroxidasa.
- Las especies de *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi* y *Toxoplasma gondii* se ocultan de los anticuerpos dentro de los macrófagos, utilizan las mismas estrategias que las bacterias parasitarias intracelulares para sobrevivir, y al igual que éstas son destruidas cuando las citocinas producidas por Th1 durante las respuestas inmunitarias mediadas por células activan a los macrófagos. El NO· es un importante agente destructor.
- Las células CD8 también desempeñan una función protectora.
- La expulsión de los helmintos intestinales depende por lo común de las respuestas Th2 y requiere la acción coordinada de anticuerpos, la liberación de mucina por las células caliciformes estimuladas por citocinas y la producción de ondas peristálticas intestinales y diarrea por los mediadores de los mastocitos.
- Algunos parásitos evitan el reconocimiento disfrazándose como si fueran el huésped, sea a través del mimetismo molecular o mediante la absorción de proteínas del huésped a su superficie.
- Otros microorganismos como *Trypanosoma brucei* y las diferentes especies productoras de paludismo tienen la extraordinaria capacidad de cubrir su superficie con un antígeno dominante que es transformado por mecanismos genéticos en una molécula diferente a medida que se forman anticuerpos contra la primera variante.
- La mayor parte de los parásitos también tiende a producir supresión inespecífica de las respuestas del huésped.
- La persistencia crónica de antígeno parasitario frente a una respuesta inmunitaria da origen con frecuencia a reacciones inmunopatológicas de daño tisular, como el síndrome nefrótico por inmunocomplejos, granulomas hepáticos y lesiones autoinmunitarias cardíacas. La inmunosupresión generalizada aumenta la susceptibilidad a las infecciones bacterianas y virales.
- A medida que se analizan las características de la respuesta contra la infección, se comprende con más claridad la manera de actuar de la respuesta adquirida específica para amplificar y reforzar los mecanismos inmunitarios innatos; las interacciones se resumen en la Figura 12.28.

Enfermedades por priones

- La tembladera de las ovejas, la encefalopatía espongiforme bovina y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakobs variante son encefalopatías espongiformes transmisibles causadas por priones.
- Se desarrollan formas anormalmente plegadas de proteína del prion (PrP) proteasa-resistentes.
- Las células dendríticas foliculares en los tejidos linfoides son infectadas antes de la diseminación del agente infeccioso al sistema nervioso central.

LECTURAS ADICIONALES

Alcami A., Hill A.B. & Koszinoski U.H. (2006) Viral interference with the host immune response. In Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections 10th edn., pp. 617–644. Wiley-Blackwell, Oxford.

Berg D.E. & Kalia A. (2011) Pathogen evolution in adaptive landscapes. Annual Review of Microbiology 65.

Black R.E., Cousens S., Johnson H.L. et al. (2010) Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. The Lancet 375, 1969–1987.

Blue C.E., Spiller O.B. & Blackbourn D.J. (2004) The relevance of complement to virus biology. Virology 319, 176–184.

Flannagan R.S., Cosío G. & Grinstein S. (2009) Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. Nature Reviews Microbiology 7, 355–366.

Goering R. et al. (2007) Medical Microbiology, 4th edn. Mosby, London.

Hansen T.H. & Bouvier M. (2009) MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies. Nature Reviews Immunology 9, 503–513.

Lambris J.D., Ricklin D. & Geisbrecht B.V. (2008) Complement evasion by human pathogens. Nature Reviews Microbiology 6, 132–142.

Lewis D.B. (2006) Avian flu to human influenza. Annual Review of Medicine 57, 139–154.

Lloyd-Smith J.O. et al. (2009) Epidemic dynamics at the human-animal interface. Science 326, 1362–1367.

Papayannopoulos V. & Zychlinsky A. (2009) NETs: a new strategy for using old weapons. Trends in Immunology 30, 513–521.

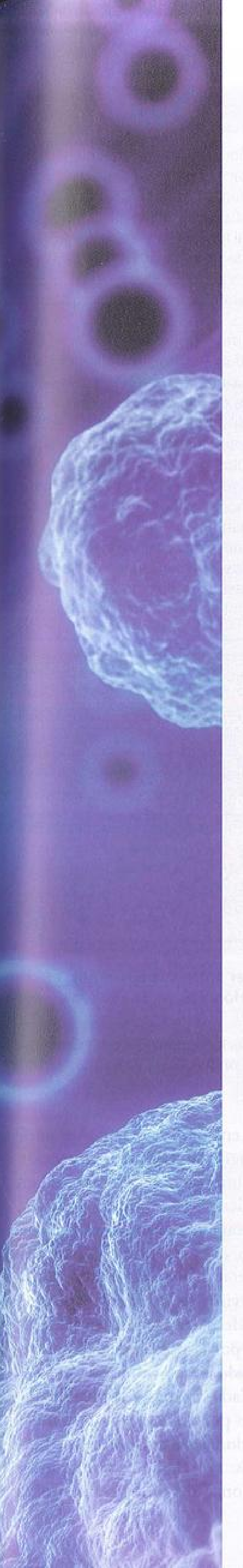
Romani L. (2004) Immunity to fungal infections. Nature Reviews Immunology 4, 1–23.

Schmid-Hempel P. (2009) Immune defence, parasite evasion strategies and their relevance for 'macroscopic phenomena' such as virulence. Philosophical Transactions of the Royal Society B 364, 85–98.

Templeton T.J. (2009) The varieties of gene amplification, diversification and hypervariability in the human malaria parasite, Plasmodium falciparum. Molecular & Biochemical Parasitology 166, 109–116.

The following websites of the Centers for Disease Control and Prevention contain a large body of information: http://www.cdc.gov/DiseasesConditions/, Parasitic diseases: http://www.cdc.gov/parasites/





CAPÍTULO 13 Vacunas

Conceptos clave

A modo de resumen...

Se han examinado los mecanismos por los cuales resistimos el ataque de los microorganismos. Estos mecanismos incluyen la inmunidad humoral, la inmunidad celular y la inmunidad innata. Uno de los grandes triunfos de la medicina ha sido la capacidad de aprovechar estos mecanismos a través de la vacunación para proteger contra una gran cantidad de enfermedades infecciosas.

Introducción

El control de las infecciones puede enfocarse desde varios aspectos. Los adelantos en la toma de medidas de salud pública, como el suministro de agua potable, los sistemas de tratamiento de las aguas residuales y la educación acerca de la higiene personal, previenen la diseminación del cólera y de muchas otras enfermedades. Los antibióticos han tenido un impacto fundamental sobre las enfermedades bacterianas. Otra estrategia es ayudar a la respuesta inmunitaria, lo cual puede lograrse con la administración de sus componentes individuales, como defensinas o anticuerpos, el empleo de agentes inmunopotenciadores, como citocinas, o con mayor frecuencia, por la exposición del sistema inmunitario a un antígeno para estimular la respuesta adquirida con el fin de generar células de memoria, procedimiento denominado vacunación (Avances y descubrimientos 13.1). Tradicionalmente, las vacunas se emplearon para generar respuestas contra los agentes infecciosos, pero también se están investigando cada vez más en áreas como el cáncer.

Roitt's Essential Immunology, Twelfth Edition. Peter J. Delves, Seamus J. Martin, Dennis R. Burton, Ivan M. Roitt.

Avances y descubrimientos 13.1—Vacunación

La noción de que los sobrevivientes de enfermedades infecciosas graves rara vez contraen de nuevo la infección ha permanecido arraigada en la tradición popular durante siglos. En relación con la terrible peste que azotó a Atenas, Tucídides observó que en principio aquellos que atendían a los enfermos eran individuos que ya se habían infectado y recuperado de la peste. En China, durante la Edad Media eran comunes los intentos deliberados de controlar las infecciones mediante la inducción de formas menores de la enfermedad en individuos sanos en otros aspectos. Allí desarrollaron la práctica de inhalar un polvo elaborado con costras de la **viruela** como protección contra cualquier infección futura. Los indios inoculaban material proveniente de las costras en pequeñas laceraciones de la piel; esta práctica de **variolización** (del latín *varus*, enfermedad facial pustulosa) se introdujo en Turquía, donde los habitantes estaban decididos a prevenir los estragos de la epidemia de viruela que interfería en el lucrativo negocio de la venta de sus vistosas hijas para los harenes de los ricos.

El escritor Voltaire, en 1773, expresa que el mérito por la difusión de la práctica de la variolización en Europa Occidental debería atribuirse a Lady Wortley Montague, una mujer muy emprendedora, esposa del embajador inglés en Constantinopla durante el reinado de Jorge I. Con pocos escrúpulos, inoculó viruela en su propia hija ante las protestas de su capellán, quien pensaba que el procedimiento sólo podría tener éxito con los infieles y no con los cristianos. Todo resultó bien, sin embargo, y la práctica fue adoptada en Inglaterra a pesar de la peligrosa naturaleza del procedimiento, que tenía una mortalidad del 0,5 al 2% de los casos. Se tomaban estos riesgos terribles porque en esa época, como registró Voltaire, "[...] sesenta personas de cada cien adquieren la viruela. De éstas, veinte mueren por la enfermedad en la mejor etapa de su vida y muchas más conservan las desagradables cicatrices en el rostro por el resto de sus vidas".

Edward Jenner (1749-1823) (Figura A13.1.1), un médico rural en Gloucestershire, le sugirió a una de sus pacientes que podía tener viruela, pero ella le aseguró que eso era imposible porque ya había contraído la viruela vacuna durante sus tareas como ordeñadora (¡otra vez la tradición popular!). Esto condujo a Jenner a realizar una serie de experimentos en los que demostró que la inoculación previa con la viruela vacuna, que era avirulenta (es decir, no patógena) en el ser humano, protegía contra la exposición posterior a la viruela humana. Sus ideas encontraron al comienzo una oposición violenta, pero por fin fueron aceptadas y adquirió fama mundial; las sociedades científicas de todas partes lo eligieron miembro, aunque llama la atención que el Colegio de Médicos de Londres lo obligara a aprobar un examen sobre los clásicos y que la Sociedad Real lo convirtiera en miembro por su trabajo sobre el comportamiento nidatorio del cuclillo. Al final inoculó a miles de personas en el cobertizo del jardín de su casa de Berkeley, Gloucestershire, que ahora funciona como museo y sede de pequeños simposios (un sitio bastante divertido para visitar si usted tiene la oportunidad).

El progreso siguiente en el desarrollo de vacunas se produjo por la labor de investigación de Louis Pasteur, quien había elaborado la teoría microbiana de la enfermedad. Un cultivo de bacilos del cólera aviar, que había dejado por accidente en un escritorio durante los meses calurosos del verano, perdió mucho de su capacidad para causar enfermedad; no obstante, las aves que habían sido inoculadas con ese cultivo viejo adquirieron resistencia a cultivos recientes de bacilos virulentos. Esta **atenuación** de microorganismos **virulentos** fue reproducida por Pasteur para el carbunco y la rabia mediante el uso de cultivos y condiciones de pasaje anormales. Reconociendo la importancia de las investigaciones de Jenner para sus propios experimentos, Pasteur denominó al tratamiento que empleaba **vacunación**, término que ha resistido la prueba del tiempo.



Figura A13.1.1. Edward Jenner entre sus pacientes, en el Smallpox and Inoculation Hospital en St. Pancras, Londres

Grabadado de Gillray, 1802. (Cortesía del Wellcome Centre Medical Photographic Library, London.)

Inmunidad adquirida en forma pasiva

Anticuerpos administrados en forma pasiva

La protección temporaria contra la infección o la eliminación de toxinas puede lograrse mediante la administración de anticuerpos preformados aislados a partir del plasma de un individuo que tenga altos títulos de anticuerpos contra el patógeno o de un animal hiperinmunizado (Cuadro 13.1; Figura 13.1). Antes de la introducción de los antibióticos, se utilizaba como profilaxis el suero equino que contenía antitoxinas tetánica o diftérica, pero hoy en día suele emplearse con menos frecuencia debido a la complicación que representa la enfermedad del suero (hipersensibilidad de tipo III) y la hipersensibilidad inmediata (tipo I) que se produce en respuesta a la proteína extraña. Además, a medida que los anticuerpos adquiridos se usan en combinación con el antígeno o se catabolizan de la manera habitual, esta protección se pierde. En la actualidad, la inmunización pasiva está en gran medida limitada a los anticuerpos contra los venenos, cuando se requiere un efecto terapéutico inmediato para un acontecimiento, en general raro, como la mordedura de serpientes, y en la profilaxis de ciertas infecciones virales, como el citomegalovirus (CMV) y el virus de la rabia. Sin embargo, con la aparición de cepas de bacterias resistentes a los antibióticos y la preocupación por la posibilidad del bioterrorismo, hay un interés renovado en la inmunización pasiva contra agentes infecciosos. Cada vez más, es probable que las preparaciones de anticuerpos policlonales sean remplazadas por los anticuerpos monoclonales humanos o las combinaciones de estos anticuerpos. Por ejemplo, se está utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón humanizado

Cuadro 13.1. Ejemplos de inmunoterapia pasiva contra infecciones y toxinas.

Enfermedad	Fuente de anticuerpos	Uso
Tétanos (infección)	Policlonal humano	Antitoxina. Tratamiento de las heridas propensas al tétanos en pacientes en los que la inmunización es incompleta o incierta
Botulismo	Policlonal equino	Antitoxina. Profilaxis posterior a la exposición al botulismo
Mordedura de serpientes (varias)	Policlonal equino	Antiveneno. Tratamiento posterior a la mordedura de un ofidio venenoso
Picaduras de arañas (varias)	Policlonal equino, policlonal de conejo	Antiveneno. Tratamiento posterior a la picadura de una araña venenosa
Parálisis por picaduras de garrapatas	Policlonal de perro	Antiveneno. Tratamiento posterior a la picadura de la garrapata que produce parálisis
Mordedura de pez piedra	Policlonal equino	Antiveneno. Tratamiento posterior a la mordedura de pez piedra
Contacto con medusas	Policlonal ovino	Antiveneno. Tratamiento posterior al contacto con una medusa
Infección por hepatitis B	Policlonal humano	Antiviral. Prevención de la infección accidental en el personal de laboratorio y otro personal inoculado con virus de hepatitis B, y a los recién nacidos de madres infectadas durante el embarazo o a los portadores de alto riesgo
Rabia	Policlonal/monoclonal humano	Antiviral. Tras la mordedura de un animal posiblemente infectado
Infección por virus varicela-zóster	Policlonal humano	Antiviral. Individuos seronegativos con riesgo aumentado de varicela grave
Infección por citomegalovirus	Policlonal humano	Antiviral. Profilaxis en pacientes inmunosuprimidos
Infección por virus sincitial respiratorio	Ratón humanizado IgG1 monoclonal	Antiviral. Prevención de enfermedades de las vías respiratorias bajas en niños y lactantes de alto riesgo

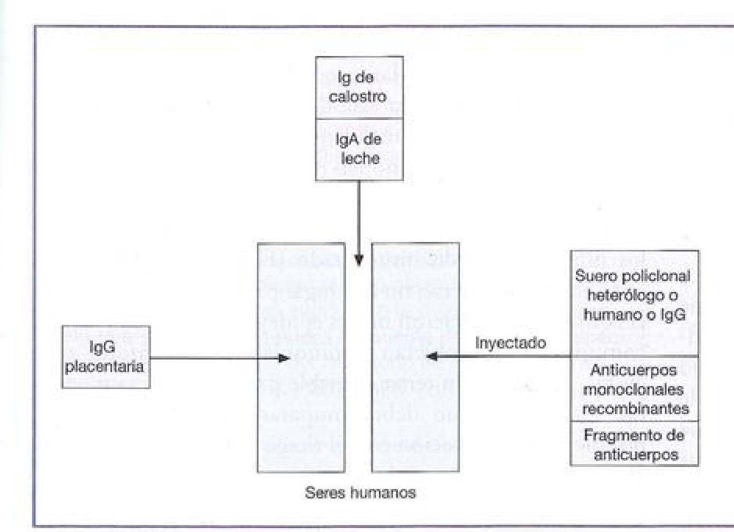


Figura 13.1. Inmunización pasiva producida por: el pasaje transplacentario de IgG de la madre al feto, la adquisición de IgA a partir del calostro y la leche de la madre por el lactante y la inyección de anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales recombinantes o fragmentos de anticuerpos (Fab o scFv).

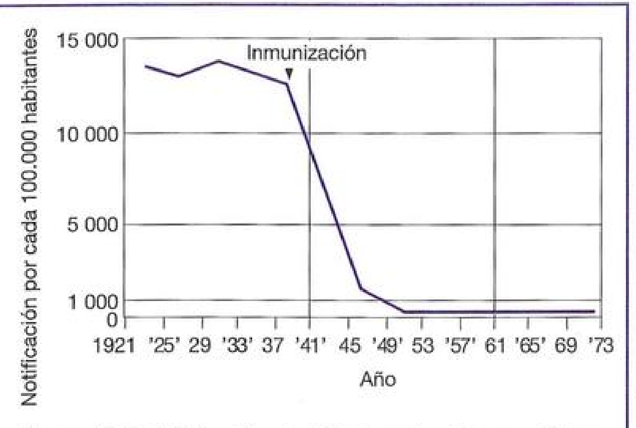


Figura 13.2. Notificación de difteria en Inglaterra y Gales por cada 100.000 habitantes, que muestra una disminución notable después de la inmunización.

(Reproducido de Dick G. [1978] *Immunisation*. Update Books; con permiso del autor y de la editorial.)

(Synagis®, MedImmune) para prevenir la enfermedad debida al virus sincitial respiratorio (VSR) en bebés y lactantes pequeños. Asimismo, se está desarrollando un cóctel de dos anticuerpos monoclonales humanos contra el virus de la rabia para su uso como profilaxis posexposición tras una lamida o un arañazo de un animal rabioso, como un perro o un murciélago. En este caso, hay una ventana de posibilidad para intervenir, ya que el virus de la rabia necesita acceder al sistema nervioso central para causar la enfermedad, y los anticuerpos circulantes pueden evitarla. En el tratamiento de la rabia, a los anticuerpos administrados en forma pasiva se les suman los anticuerpos generados por la vacunación.

Anticuerpos adquiridos a partir de la madre

En los primeros meses de vida, mientras el sistema linfoide del niño se va desarrollando con lentitud, la protección es proporcionada al feto por los anticuerpos IgG provenientes de la madre, que atraviesan la placenta y al neonato por absorción intestinal de las inmunoglobulinas del calostro (Figura 13.1). La principal inmunoglobulina en la leche es la IgA secretoria (SIgA), y si bien el recién nacido no la absorbe, permanece en el intestino para proteger la superficie de la mucosa. En este aspecto es bastante llamativo que los anticuerpos SIgA a menudo se dirijan contra antígenos bacterianos y virales presentes en el intestino, y se presume que las células productoras de IgA, que responden a los antígenos intestinales, migran y colonizan el tejido mamario (como parte del sistema inmunitario de las mucosas, donde los anticuerpos que generan aparecen en la leche. Es firme el argumento de la vacunación de las mucosas de futuras madres contra determinadas infecciones. También cabe señalar que se ha argumentado que una de las funciones más importantes de los anticuerpos se cumple cuando se adquieren a partir de la madre. La hipótesis es que los anticuerpos maternos atenúan muchas infecciones, lo que le permite a la inmunidad celular madurar en condiciones controladas.

Inmunoglobulina intravenosa (IgIV)

La inmunoglobulina intravenosa (IgIV) es un preparado de IgG obtenido por fraccionamiento en gran escala de plasma proveniente de miles de donantes de sangre sanos. Se administra a individuos que padecen inmunodeficiencias asociadas con anticuerpos circulantes reducidos o ausentes. La IgIV también es de valor en el tratamiento de algunas enfermedades infecciosas como el síndrome del shock tóxico estreptocócico. Asimismo, la IgIV es eficaz para el tratamiento de varias enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias, como la púrpura trombocitopénica idiopática, la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica y el síndrome de Guillain-Barré. Aún no está claro su mecanismo de acción en estos pacientes sin inmunodeficiencia, si bien evidencias recientes sugieren que es probable que la IgIV module la actividad inmunitaria a través de los ácidos siálicos de la molécula de inmunoglobulina.

Transferencia adoptiva de células T citotóxicas

Esta es una operación muy laboriosa y estará restringida a las células autólogas o a los casos en los que el donante comparte un alelo de los genes de moléculas de clase I del CMH. Se demostró que la transferencia adoptiva de linfocitos T citotóxicos autólogos es eficaz para reforzar las respuestas inmunitarias específicas contra el virus de Epstein-Barr (EBV) y para reducir la carga viral en pacientes con enfermedad linfoproliferativa postrasplante.

Principios de la vacunación



Inmunidad comunitaria

En el caso del tétanos, la inmunización activa es beneficiosa para el individuo pero no para la comunidad, ya que no elimina el microorganismo que se encuentra en las heces de los animales domésticos y persiste en el suelo en la forma de esporas muy resistentes. Cuando una enfermedad depende de la transmisión humana, la inmunidad en una parte de la población puede ayudar a toda la comunidad si conduce a una disminución de la tasa de reproducción (es decir, el número de casos adicionales que produce cada individuo infectado) a menos de uno; en estas circunstancias, la enfermedad se extinguirá, como lo atestigua, por ejemplo, la desaparición de la difteria en poblaciones en las que el 75% de los niños había sido inmunizado (Figura 13.2). Pero esta cifra debe mantenerse; no hay lugar para complacencias. Por el contrario, aparecieron brotes epidémicos de sarampión en comunidades que objetan la inmunización por razones religiosas, lo cual es un tema opinable para los padres en general. Cada individuo debe comparar cualquier desventaja posible de la vacunación con el riesgo mayor de enfermedad en el niño no inmunizado.

Cómo actúan las vacunas

Las vacunas son eficaces debido a la inmunidad adaptativa y a la memoria inmunitaria. La memoria de los anticuerpos existe en dos compartimientos. Primero, como anticuerpos preexistentes en la sangre y en los tejidos listos para

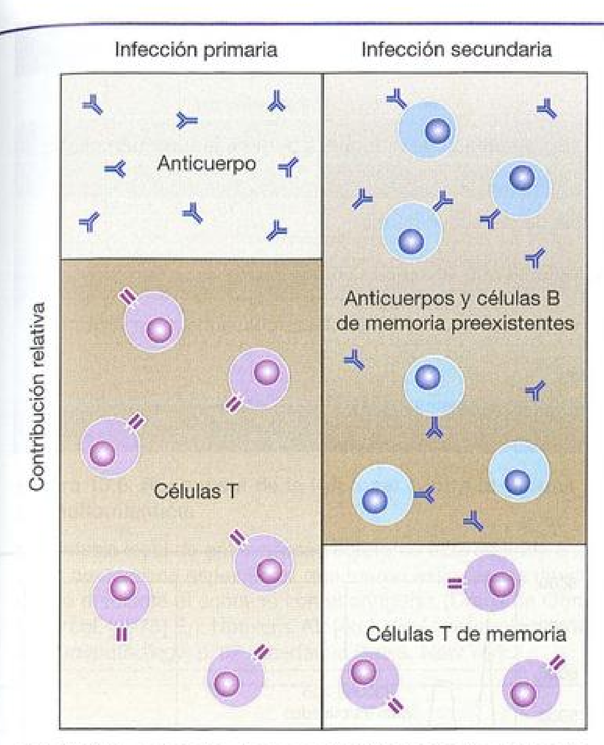


Figura 13.3. Esquema de las contribuciones relativas de la inmunidad humoral y celular durante la infección viral primaria o secundaria.

Durante la infección viral primaria, las respuestas antivirales de células T son fundamentales para reducir la replicación viral, además de contribuir al desarrollo de la respuesta de anticuerpos eficaces. Las respuestas primarias de anticuerpos dependientes de la célula T se generan en el curso de la infección y toman tiempo para llevar a cabo la hipermutación somática y el cambio de clase de inmunoglobulina para prestar, tal vez, asistencia a las células T específicas dirigidas contra el virus para resolver la infección. Tras la recuperación de la infección primaria (o vacunación), los anticuerpos persistentes específicos contra el virus representan la primera línea de defensa contra la infección secundaria. Si se produce una infección secundaria, entonces los anticuerpos circulantes, y presumiblemente las células B de memoria que proliferan y se diferencian en células secretoras de anticuerpos, reducirán la diseminación del virus y da tiempo para el desarrollo de una respuesta antiviral de células T. Las células B de memoria son altamente eficaces en presentar el antígeno específico y, por lo tanto, también pueden participar con la presentación más rápida y eficaz a las células T. Las células T de memoria preexistentes también desempeñarán una función en la protección contra la infección secundaria. Sin embargo, aun cuando las células T de memoria disminuyan o se pierdan, el mantenimiento a largo plazo de las respuestas de anticuerpos antivirales suprimirán la replicación del virus hasta que se monte una nueva respuesta de células T específicas para el virus a partir del repertorio de células vírgenes. (Adaptado de Amanna I.J. y Slifka M.K. [2009] *Antiviral Research* **84**, 119-130.)

atacar al patógeno sin la activación celular; ésta es tal vez la primeria línea de defensa más poderosa contra la exposición a muchos patógenos. Estos anticuerpos pueden mantenerse en concentraciones relativamente elevadas durante muchos años, probablemente producidos por los plasmocitos de vida prolongada en la médula ósea, aunque esto no es aceptado de forma unánime. En cierto sentido, la parte más crucial de la memoria de los "anticuerpos" podría equipararse con la larga vida de los plasmocitos. Sin embargo, la segunda forma del componente de memoria de los anticuerpos, las células B de memoria, también podría ser fundamental para la protección mediada por la vacuna en algunos casos. Aquí, el contacto con el agente patógeno estimula la proliferación y la diferenciación de las células B para producir grandes cantidades de anticuerpos. Del mismo modo, el contacto de las células B de memoria con el patógeno puede ser importante para incrementar el número de plasmocitos y las concentraciones de anticuerpos séricos para el próximo encuentro con el agente patógeno. Las células T de memoria también existen en dos compartimientos. Las células T de memoria efectoras se encuentran en los tejidos periféricos, donde pueden responder de inmediato frente al contacto de la célula infectada por el patógeno con actividades efectoras. Las células T de memoria centrales se encuentran sobre todo en los ganglios linfáticos, donde pueden responder al contacto con el patógeno mediante la expansión y la diferenciación a células efectoras. La memoria de las células T consta de respuestas de células T tanto $CD8^+$ como $CD4^+$. Está claro que las respuestas de las células T son más pertinentes contra las infecciones por virus, parásitos y bacterias intracelulares.

El mejor correlato de la protección para muchas vacunas actuales es la producción de anticuerpos y es probable que, en estos casos, esta producción de anticuerpos sea el mecanismo más importante de la resistencia inducida por la vacuna contra la enfermedad. Esto es coherente con la noción de que las células T son la contribución más grande a la inmunidad viral durante la infección primaria y los anticuerpos lo son durante la infección secundaria (Figura 13.3). Sin embargo, es importante señalar que los mecanismos de protección de la vacuna pueden variar mucho entre los diferentes agentes patógenos, los diferentes individuos, las proximidades diferentes a las que se expone el individuo con el patógeno y las variadas vías de exposición.

Además de la capacidad para producir una inmunidad eficaz, es preciso satisfacer algunas condiciones simples, pero no obstante fundamentales, para que la vacuna sea considerada satisfactoria (Cuadro 13.2). Los antígenos tienen que ser fáciles de obtener y el preparado debe ser estable, económico y seguro si se tiene en cuenta que los receptores son a menudo niños sanos. Desde luego que el primer contacto con el antígeno durante la vacunación no debe ser perjudicial, y el objetivo será evitar los efectos patógenos de la infección, al tiempo que se mantienen los inmunógenos protectores.

En la Figura 13.4 se muestran los enfoques principales para la producción de las vacunas existentes, las que se considerarán a continuación.

Microorganismos muertos como vacunas

La manera más sencilla de anular la capacidad de los microorganismos para causar enfermedad, pero conservando su constitución antigénica, es impedir que se repliquen

Cuadro 13.2. Factores requeridos para una vacuna efectiva.

Factor	Requerimientos
Eficacia	Deben suscitar niveles de inmunidad protectores en el sitio apropiado de naturaleza pertinente (anticuerpos, Tc, Th1, Th2) de duración adecuada
Disponibilidad	Fácil de cultivar en grandes volúmenes o fuente accesible de las subunidades
Estabilidad	Estable bajo condiciones climáticas extremas; preferentemente que no requiera refrigeración
Bajo costo	Lo que es económico en Occidente puede ser costoso en los países en vías de desarrollo, aunque se reciban ayudas de la Fundación Bill y Melinda Gates y de los distintos Estados
Seguridad	Eliminación de la patogenicidad

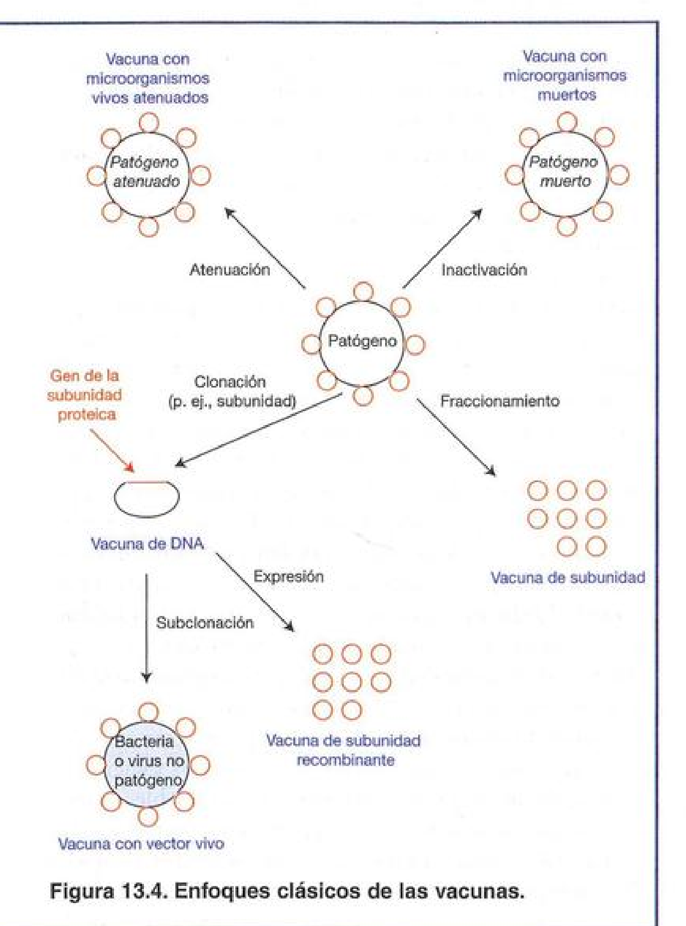


Figura 13.4. Enfoques clásicos de las vacunas.

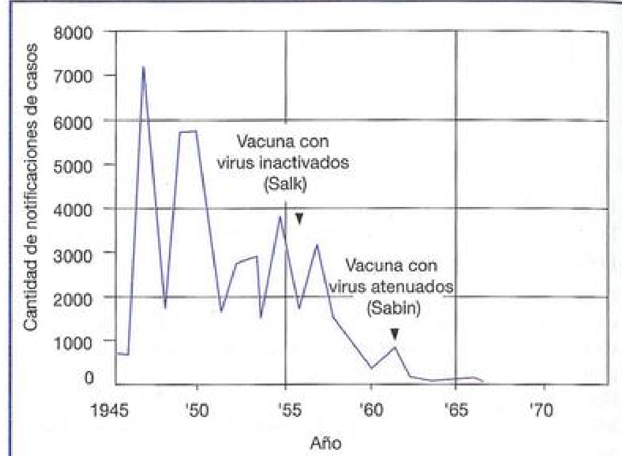


Figura 13.5. Notificaciones de poliomielitis paralítica en Inglaterra y Gales que muestran los efectos beneficiosos de la inmunización masiva con vacunas de virus muertos y vivos.

(Reproducido de Dick G. [1978] *Immunisation*. Update Books; con permiso del autor y de la editorial.)

mediante la destrucción apropiada. Los helmintos, y en menor grado los protozoos, tienen gran dificultad para crecer en grandes volúmenes como para desarrollar vacunas con agentes muertos. Este problema no se plantea en el caso de muchos virus y bacterias, en los que los microorganismos inactivados han provisto antígenos seguros para la inmunización. Son ejemplos las vacunas contra la gripe, el cólera y la poliomielitis con virus inactivados (Salk) (Figura 13.5). Deben tomarse precauciones para evitar que los antígenos protectores sean destruidos en el proceso de inactivación.

Los microorganismos vivos atenuados tienen muchas ventajas como vacunas

El objetivo de la atenuación es producir un microorganismo modificado que imite el comportamiento natural del microorganismo original sin causar una enfermedad significativa. En muchos casos, la inmunidad conferida por las vacunas con microorganismos muertos, aun cuando se administren con adyuvantes (véase más adelante), suele ser menor de la que resulta de la infección por microorganismos vivos. Esto puede deberse, en parte, a que la replicación de los microorganismos vivos enfrenta al huésped con una **dosis mayor y más sostenida de antígeno,** y porque en el caso de virus brotantes se requieren células infectadas para establecer una buena **memoria de células T citotóxicas.** Otra ventaja importante de usar microorganismos vivos es que la **respuesta inmunitaria tiene lugar, en gran medida, en el sitio de la infección natural.** Esto queda bien ilustra-

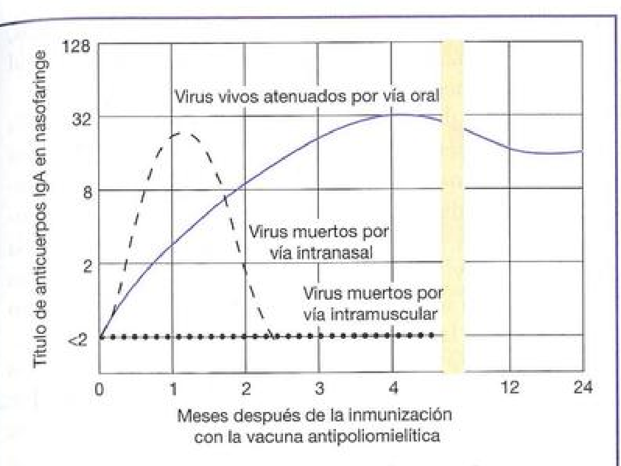


Figura 13.6. Respuesta de la IgA local contra la vacuna antipoliomielítica.

La síntesis local de anticuerpos secretores está limitada a sitios anatómicos específicos, que fueron estimulados directamente mediante el contacto con el antígeno. (Datos de Ogra PL. y col. [1975] En: Nothkins AL [ed.] *Viral Immunology and Immunopathology*, p. 67. Academic Press, New York.)

do por la respuesta nasofaríngea de IgA a la inmunización con la vacuna antipoliomielítica. Al contrario de lo que sucede con la inefectividad de la inyección parenteral de la vacuna con virus muertos, la administración intranasal induce una buena respuesta local de anticuerpos; sin embargo, mientras ésta declina en un período de dos meses o más, la inmunización por vía oral con virus *vivos atenuados* induce concentraciones de anticuerpos IgA persistentemente elevados (Figura 13.6).

Ha resurgido con intensidad el interés por estrategias de inmunización de las mucosas. Debe recordarse que el sistema MALT involucra las mucosas que revisten los tractos aerodigestivo y urogenital, así como la conjuntiva, el oído y los conductos de todas las glándulas exocrinas, en la protección de las cuales participan los anticuerpos SIgA. Las células T residentes en estos tejidos elaboran grandes cantidades de factor de crecimiento transformador β (TGFβ) y de interleucinas 10 y 4 (IL-10 e IL-4), que promueven el cambio de la célula B hacia la síntesis de IgA; adviértase también que las células del epitelio intestinal humano son, por sí mismas, las fuentes principales de TGFβ e IL-10.

Métodos clásicos de atenuación

El objetivo de la atenuación, es decir, la producción de microorganismos que sólo causan una forma muy leve de la enfermedad natural, puede alcanzarse igualmente si se identifican cepas heterólogas virulentas para otras especies, pero avirulentas para los seres humanos. El mejor ejemplo de esto fue la demostración fundamental de Jenner de que la viruela bovina podía proteger contra la viruela humana. Desde entonces, un verdadero y extraordinario esfuerzo mancomunado de la Organización Mundial de la Salud (OMS), que combina extensas campañas de vacunación con métodos selectivos de control epidemiológico, **erradicó por completo la enfermedad humana**, un logro maravilloso. Así, aunque se estima que fallecieron 300 millones de personas por viruela en el siglo XX, nadie ha muerto por el virus desde 1978. Animada por este éxito, la OMS emprendió un programa para la erradicación de la poliomielitis mediante el empleo de una vacuna con virus atenuados para bloquear la transmisión del virus, y a pesar de los contratiempos causados por la interrupción temporaria de la vacunación en el norte de Nigeria tras los rumores infundados acerca de la seguridad de la vacuna, es de esperar que este objetivo pueda cumplirse en un futuro próximo. El progreso de esta campaña se puede seguir en http://www.polioeradication.org.

La atenuación en sí misma se logró originalmente mediante la modificación empírica de las condiciones de desarrollo de los microorganismos. Pasteur consiguió por primera vez la producción de formas vivas no virulentas del bacilo del cólera aviar y del carbunco (véase Avances y descubrimientos 13.1) mediante ciertos artificios como el cultivo a altas temperaturas y en condiciones de anaerobiosis, y pudo conferir inmunidad por la infección con microorganismos atenuados. Una cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* resultó atenuada por casualidad en 1908, cuando Calmette y Guérin en el Instituto Pasteur, de Lille, Francia, agregaron bilis al medio de cultivo en un intento de dispersar el crecimiento. Al cabo de 13 años de cultivos en medios con bilis, la cepa permaneció atenuada y fue utilizada con éxito para vacunar niños contra la tuberculosis. El mismo microorganismo, BCG (bacilo de Calmette-Guérin), se utiliza ampliamente en la actualidad en muchos países para la inmunización de lactantes, y de niños y adolescentes negativos a la prueba de la tuberculina. Sin embargo, su eficacia varía en gran medida, por ejemplo, de una protección del 80% de individuos vacunados en el Reino Unido a la falta total de eficacia en el sur de la India. Esta variabilidad no ha sido aclarada por completo, pero se cree que depende de factores como las diferencias locales en la composición antigénica de la vacuna y en las cepas micobacterianas ambientales, así como en diferencias en los alelos del CMH y otros factores genéticos en las diversas poblaciones humanas. La atenuación por adaptación al frío se aplicó al virus de la gripe y otros virus respiratorios; los microorganismos pueden proliferar a bajas temperaturas (32 a 34 °C) de las vías respiratorias superiores, pero no pueden producir enfermedad clínica en las vías respiratorias inferiores (37 °C) por su incapacidad para replicarse. En 2003 se aprobó en los Estados Unidos una vacuna intranasal que contiene cepas de virus de la gripe atenuadas adaptadas al frío.

Atenuación por tecnología de DNA recombinante

Muchos de los métodos clásicos de atenuación son algo empíricos y el resultado es difícil de controlar o de predecir. Con el conocimiento de la caracterización genética de estos microorganismos, podemos aplicar el delicado escalpelo del biólogo molecular para apuntar deliberadamente a las alteraciones del estilo de vida que son necesarias para una atenuación efectiva. La recombinación genética se está utilizando para desarrollar algunas cepas de virus atenuados, como el virus de la gripe, no sólo con baja virulencia para los seres humanos, sino también con una mayor velocidad de multiplicación en huevos (que permite adaptar las nuevas cepas

endémicas del virus de la gripe para la producción rápida de vacunas). No es sorprendente que se estén investigando como vacunas protectoras cepas del HIV-1 con deleciones viciosas en sus genes reguladores. Queda claro que el potencial es enorme.

Es muy probable que en un futuro cercano se aproveche el **tropismo** de los microorganismos atenuados por **el sitio** donde ocurre la **infección natural** para establecer la inmunidad intestinal contra la fiebre tifoidea y el cólera, mediante el uso de formas atenuadas de cepas de *Salmonella typhi* y *Vibrio cholerae* en las que se identificaron los genes de virulencia y fueron modificados por ingeniería genética.

Vectores microbianos como vacunas

Una treta ingeniosa consiste en utilizar un virus no patógeno como portador (similar al caballo de Troya) para los genes que codifican proteínas de un patógeno. La incorporación de estos genes "extraños" dentro de vectores virales recombinantes atenuados como el virus de la viruela aviar y la cepa Ankara del virus modificado de la vacuna (vaccinia), que infecta huéspedes mamíferos pero es incapaz de replicarse en forma eficaz, proporciona una poderosa estrategia de vacunación con muchos beneficios. Los genes pueden derivar de microorganismos de crecimiento dificultoso o de peligrosidad inherente, y sus productos en sí mismos son de replicación deficiente, no se integran, son estables y relativamente fáciles de preparar. Las proteínas codificadas por estos genes se expresan en forma apropiada *in vivo*, en lo que respecta a la glucosilación y la secreción, y son procesadas para la presentación por el CMH por las células infectadas, de tal forma que dotan al huésped con inmunidad humoral e inmunidad mediada por células.

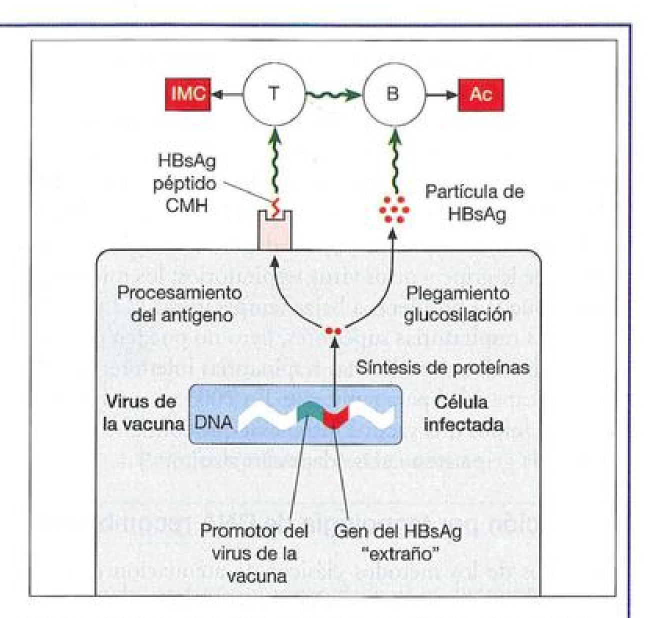


Figura 13.7. Vacuna que contiene el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y que utiliza un transportador del virus de la vacuna (vaccinia) atenuado.

La proteína del HBsAg es sintetizada por la maquinaria celular de la célula huésped: una parte es secretada para formar la partícula de 22 nm que estimula la producción de anticuerpos (Ac), y otra parte continúa la vía de procesamiento del antígeno para estimular la inmunidad celular (IMC) y la actividad de las células T *helper*.

Los vectores del virus de la vacuna expresan una amplia variedad de genes, y se demostró que los productos de genes que codifican proteínas de la cubierta viral, como la hemaglutinina del virus de la gripe, la glucoproteína del virus de la estomatitis vesicular, la gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana-1 (HIV-1) y la glucoproteína D del virus del herpes simple, podrían ser procesados en forma correcta. El antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) fue secretado por células infectadas por el virus de la vacuna recombinante como las partículas características de 22 nm (Figura 13.7). Se trata de un método que impresiona y con el cual se protegió a los chimpancés de los efectos clínicos del virus de la hepatitis B, mientras que los ratones inoculados con la hemaglutinina recombinante del virus de la gripe generaron células T citotóxicas y quedaron protegidos de la infección.

La atención se ha centrado en el bacilo de Calmette-Guérin como vehículo de los antígenos requeridos para la inducción la inmunidad celular T mediada por CD4. El microorganismo es avirulento, se asocia con baja frecuencia de complicaciones graves, puede administrarse en cualquier momento después del nacimiento, tiene propiedades adyuvantes potentes y proporciona una IMC duradera tras una sola inyección.

La capacidad de *Salmonella* para inducir **respuestas de la mucosas por inmunización oral** se aprovechó mediante el diseño de vectores que permiten la expresión de cualquier antígeno proteico ligado a la enterotoxina de *E. coli*, un poderoso inmunoestimulante de la mucosa. Una posibilidad interesante es que la vía oral de vacunación sea aplicable no sólo para establecer inmunidad en la mucosa intestinal, sino también para aportar una protección sistémica. Por ejemplo, *Salmonella typhimurium* invade la capa mucosa que recubre el intestino e infecta asimismo las células del sistema fagocítico mononuclear de todo el organismo, con lo cual estimula la producción de anticuerpos humorales secretores, así como la inmunidad celular mediada por células $CD4^+$ y $CD8^+$. Ya que puede lograrse que una cepa de *Salmonella* atenuada exprese proteínas de *Shigella*, cólera, esporozoítos de paludismo, etc., es absolutamente factible considerarla como vacuna oral potencial. *Salmonella* también puede transportar "genes extraños" dentro de plásmidos separados de DNA, y después de la fagocitosis por las células presentadoras de antígenos, los plásmidos pueden ser liberados desde los fagosomas hacia el citosol si portan un gen de listeriolisina recombinante o si la bacteria es un mutante cuyas paredes celulares se desintegran dentro del fagosoma; el plásmido se moviliza luego hacia el núcleo, donde es transcrito para producir el antígeno deseado. Es bastante llamativo que estos microorganismos atenuados sean muy eficaces cuando son inhalados y puedan inducir respuestas inmunitarias sustanciales sistémicas y de las mucosas comparables con las obtenidas por vía parenteral.

Limitaciones en el uso de vacunas atenuadas

Las vacunas atenuadas contra la poliomielitis (Sabin), el sarampión, la parotiditis, la rubéola, la infección por varicela-zóster y la fiebre amarilla ganaron aceptación general. Sin

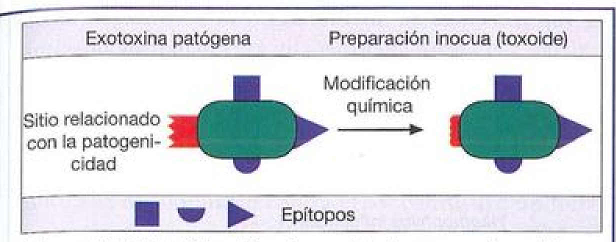


Figura 13.8. Modificación de una toxina en un toxoide inocuo sin perder muchos de los determinantes antigénicos.

De este modo, los anticuerpos elaborados contra el toxoide reaccionarán bien contra la toxina original.

embargo, con las vacunas de virus vivos existe la posibilidad de que el ácido nucleico pueda incorporarse al genoma del huésped o que se reviertan hacia una forma virulenta. La reversión es menos probable si las cepas atenuadas contienen varias mutaciones. Otra desventaja de las cepas atenuadas es la dificultad y el costo de mantenimiento de conservación en frío, en especial en lugares alejados de los centros urbanos. En enfermedades como la hepatitis viral, el sida y el cáncer, los peligros asociados con las vacunas de agentes vivos desalientan su uso. La mayoría de las vacunas plantea un riesgo pequeño pero real de desarrollar complicaciones, y no es exagerado destacar que **este riesgo debe sopesarse con la probabilidad esperada de contraer la enfermedad con sus propias complicaciones.** Cuando éste es mínimo, algunos prefieren evitar la vacunación general y, en caso necesario, contar con el rápido respaldo de la inmunización pasiva en aquellas localidades en que aparezcan brotes aislados de la enfermedad infecciosa.

Es importante identificar a los niños con inmunodeficiencia antes de inyectarles microorganismos vivos; un niño con un deterioro en la reactividad de las células T puede ser superado por la BCG y fallecer. Tampoco es aconsejable administrar vacunas con microorganismos vivos a pacientes tratados con corticoides, fármacos inmunosupresores o radiaciones, o que padecen enfermedades malignas como linfomas o leucemia; las mujeres embarazadas también deben ser incluidas a causa de la vulnerabilidad del feto.

Uso en el contexto veterinario

Por supuesto hay una preocupación menor por los efectos colaterales mínimos cuando las vacunas son para uso veterinario; por ejemplo, se obtuvieron resultados excelentes con cepas del virus de la vacuna para prevenir la "tristeza bovina" y la rabia en los zorros. En este último caso se distribuyó desde el aire un cebo con el virus de la vacuna recombinante, que expresaba la glucoproteína de superficie del virus de la rabia e inmunizó al 80% de los zorros de esa región. Desde entonces no se detectó ningún caso de rabia, pero las consideraciones epidemiológicas indican que con la mayor densidad de zorros resultante, más alto será el porcentaje de los que deban ser inmunizados. Por lo tanto, será necesario aumentar la eficacia de la vacuna o continuar la selección de los animales, una consecuencia interesante de la interferencia con los ecosistemas. En ciertas reservas de animales es menos complicado el uso de la mencionada inmunización para controlar brotes locales de rabia en algunas especies raras de mamíferos, como el perro salvaje africano, amenazadas de extinción por el virus.

Vacunas de subunidades

Un microorganismo entero por lo general contiene muchos antígenos que no participan en la respuesta protectora del huésped, pero pueden originar problemas por la supresión de la respuesta contra los antígenos protectores o porque provocan hipersensibilidad, como se expresó en el capítulo anterior. La vacunación con los antígenos protectores aislados puede evitar esas complicaciones; la identificación de tales antígenos abre la posibilidad de producirlos en forma sintética en los casos en que es impracticable el crecimiento del microorganismo en gran escala o es demasiado costoso el aislamiento de los componentes individuales.

Uso de componentes purificados como vacunas bacterianas

Las exotoxinas bacterianas, como las producidas por los bacilos de la difteria y del tétanos, se utilizan como inmunógenos desde hace mucho tiempo. Primero, por supuesto, deben ser detoxificados (eliminar la capacidad tóxica) mediante el tratamiento con formaldehído que, afortunadamente, no destruye los principales determinantes inmunógenos (Figura 13.8). La inmunización con el **toxoide** provocará, en consecuencia, la formación de anticuerpos protectores que neutralizarán la toxina por el bloqueo estereoquímico del sitio activo y facilitarán su eliminación por las células fagocíticas. Generalmente, el toxoide se administra tras su adsorción en hidróxido de aluminio, que actúa como un adyuvante y produce títulos elevados de anticuerpos. Además de su uso como vacunas para generar una respuesta de anticuerpos protectores contra el tétanos y la difteria, los toxoides suelen conjugarse con otras proteínas, péptidos o polisacáridos con el fin de mantener epítopos para células T *helper* de estos antígenos. También pueden usarse variantes no tóxicas de las toxinas en sí, como la variante CRM197 de la toxina diftérica, con el objeto de aportar epítopos para la célula T *helper* de antígenos como el polisacárido de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib).

El énfasis se desplaza ahora hacia la clonación génica de proteínas individuales, una vez que se las haya identificado en forma inmunológica y bioquímica. En general, una subunidad proteica utilizada en una vacuna debe contener un número suficiente de epítopos de células T para evitar la falta de respuesta relacionada con los antígenos leucocíticos humanos (HLA) en la población inmunizada. Con el objeto de mantener la dotación de células B de memoria durante un período razonable, se necesita que el antígeno persista sobre las células dendríticas foliculares en una forma resistente a la degradación proteolítica y retenga su configuración tridimensional nativa.

Una vacuna viral de subunidades: virus de la hepatitis B (HBV)

En 1965, Baruch Blumberg describió por primera vez un antígeno en la sangre de aborígenes australianos asociado

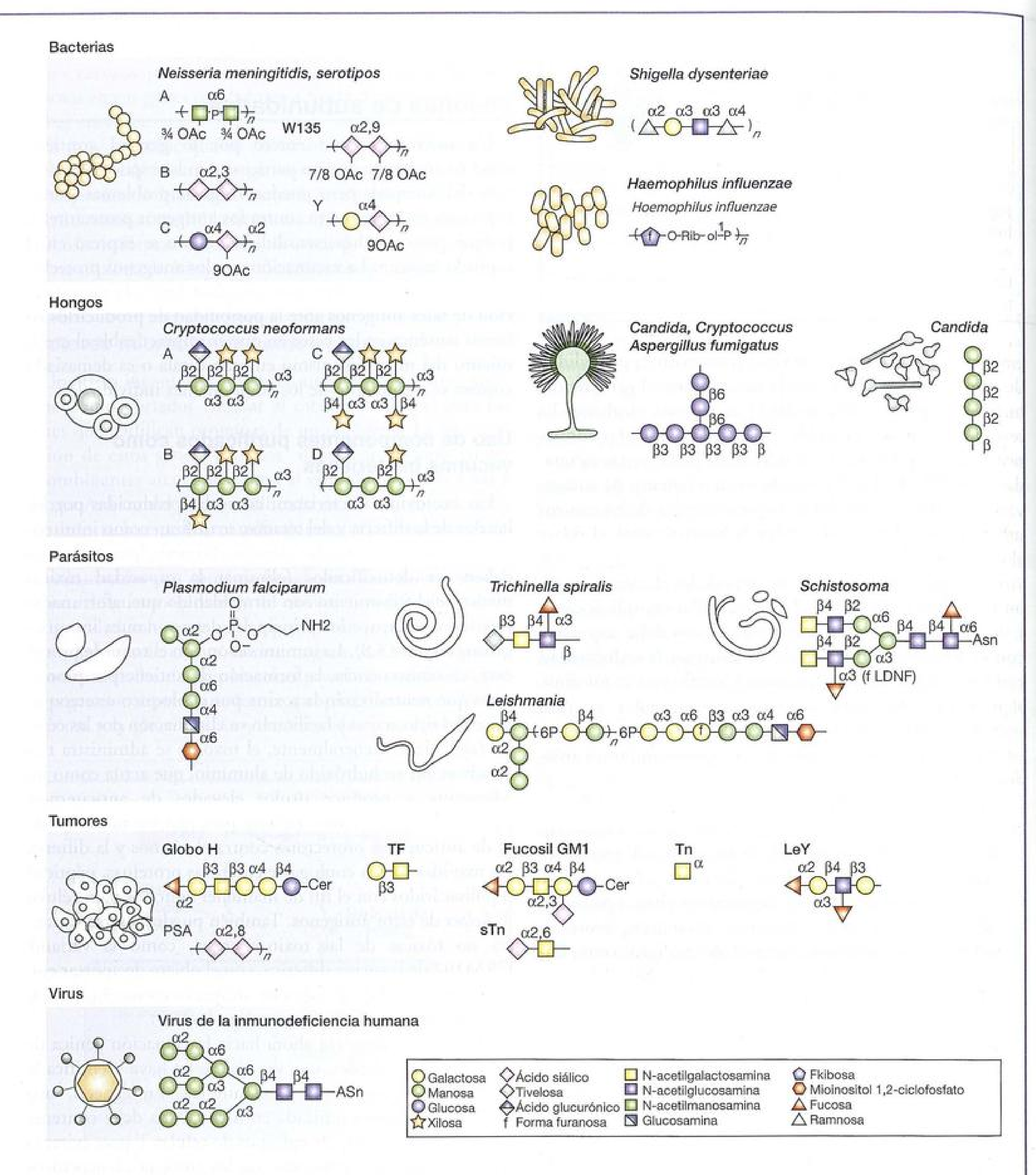


Figura 13.9. Una serie diversa de agentes que causan enfermedad y antígenos glucanos está dirigida por las vacunas con hidratos de carbono existentes y en desarrollo.

Bacterias: repeticiones de polisacárido capsular asociadas con especies particulares (y serotipos). Hongos: motivos de glucuronoxilomanano (GXM) comunes para los serotipos A-D *(Cryptococcus);* β-glucano *(Candida, Cryptococcus* y *Aspergillus);* β-manano *(Candida).* Parásitos: motivo glucosilfosfatidilinositol sintético *(Plasmodium falciparum):* antígeno que contiene tivelosa *(Trichinella);* LacdiNAc (LDN) y LDN fucosilada (LDNF) *(Schistosoma*); lipofosfoglucano común *(Leishmania).* Tumores: antígenos comunes de glucano asociados con glucolípidos (globohexaosilceramida (Globo H), fucosil GM1, Lewis Y (Le^y)) and glucoproteínas (Thomsen-Friedenreich (TF), Le^y, 2-6-a-N-acetilgalactosamina (Tn), sialil Tn y ácido polisiálico (PSA)) encontrado en varios tejidos malignos. Virus: elevada cantidad de manosa $GlcNAc_2Man_9$ (HIV). Los residuos de manosa pueden estar 6-O-acetilados sobre los motivos de GXM. (De Astronomo R.D. y Burton D.R. [2010] *Nature Reviews Drug Discovery* *9*, 308-324).

con la hepatitis. Con posterioridad, se demostró que este "antígeno australiano" es una partícula formada a partir del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. En un inicio, las partículas antigénicas se aislaron del plasma de portadores de hepatitis B y se inactivaron y utilizaron como vacuna. Más tarde, las partículas se prepararon en levaduras. La vacuna de subunidad contra HBV constituyó un hito en la ciencia del desarrollo de vacunas (vacunología), ya que fue la primera fabricada mediante la tecnología de DNA recombinante. Una faceta muy interesante de esta vacuna es que originalmente se utilizó para pequeños grupos de riesgo expuestos a productos sanguíneos, como médicos y enfermeros. Más tarde, su uso se difundió ampliamente, incluso en los países en vías de desarrollo. Como el HBV se asoció con cáncer hepático y más de 300 millones de personas están infectadas en todo el mundo, la vacuna anti-HBV representa la primera para prevenir el cáncer en gran escala.

Vacunas de hidratos de carbono

La distribución superficial densa de las estructuras características de glucanos en los diversos patógenos y en las células malignas convierten a los hidratos de carbono en sitios de acción atractivos para las vacunas basadas en anticuerpos (Figura 13.9). Sin embargo, la naturaleza de los glucanos presenta algunos problemas importantes en términos de la inducción de anticuerpos protectores. En primer lugar, los glucanos tienden a ser inmunógenos deficientes; deben ser acoplados a una proteína transportadora para proporcionar una fuente de células T *helper* $CD4^+$. En segundo lugar, es típico que los anticuerpos dirigidos contra los glucanos tengan bajas afinidades en relación con los anticuerpos dirigidos contra las proteínas. Ellos dependen en gran medida de los efectos de la avidez para lograr la unión en concentraciones fisiológicas. En tercer lugar, los glucanos son típicamente heterogéneos en los patógenos o las células diana y, por lo tanto, se diluye la eficacia de cualquier respuesta específica antiglucano. No obstante, cada vez más se diseñan glucoconjugados (Figura 13.10) como candidatos para las vacunas. Las vacunas de hidratos de carbono autorizadas incluyen aquellas contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), *Neisseria meningitidis, Salmonella typhi* y *Streptococcus pneumoniae.*

Vacunas de DNA

Los equipos de profesionales que trabajan con J. Wolff y P. Felgner experimentaron con una nueva estrategia de terapia génica que implicó la unión del DNA cargado negativamente con lípidos catiónicos que se adherían a la superficie con carga negativa de las células viables y luego, al parecer, ganaban acceso a éstas. La sorpresa fue que los controles a los que se les inyectó DNA sin los lípidos presentaron una *captación incluso mayor de DNA* y, por consiguiente, de la expresión de la proteína que codificaba, lo cual dio origen a toda una tecnología nueva de **vacunas de DNA o inmunización genética**. Como señaló Wolff: "Tratamos de nuevo y funcionó. Alrededor de la cuarta o quinta vez supimos que estábamos descubriendo algo importante. Aún hoy siento escalofríos cuando veo que funciona". Con rapidez, se advirtió que la inyección de DNA actúa como una fuente de inmunógeno in situ y puede inducir respuestas inmunitarias intensas, sobre todo de la inmunidad celular. El DNA utilizado en este procedimiento a veces se denomina **DNA desnudo** para reflejar que el ácido nucleico es despojado de sus proteínas asociadas.

La unidad de transcripción compuesta por el cDNA del gen con un poli-A de terminación se inserta en un DNA del plásmido con un promotor como el del citomegalovirus y una secuencia bacteriana CpG a modo de un adyuvante muy potente. Por lo general, se inyecta en el músculo, en donde puede generar una expresión prolongada de la proteína. Sin duda, la célula principal es la dendrítica presentadora de antígeno, que puede ser transfectada directamente, endocitar el antígeno soluble secretado hacia los espacios intersticiales del músculo y captar las células muertas o dañadas por la vacuna. Las secuencias inmunoestimulantes CpG ocupan el receptor 9 de tipo Toll (TLR9) y, por lo tanto, inducen la síntesis de IFNα e IFNβ, IL-12 e IL-18, que estimulan la formación de células T *helper* (Th) 1; a su vez, esto genera una buena inmunidad mediada por células, contribuye a la síntesis de ciertas clases de anticuerpos por las células B (p. ej., IgG2a en el ratón) e induce una buena respuesta de células T citotóxicas, lo cual refleja presumiblemente la expresión citosólica de la proteína y su procesamiento en la vía del CMH de clase I. Veamos un ejemplo. Se recordará que las mutaciones puntuales frecuentes (deriva) en el gen que codifica la hemaglutinina de superficie del virus influenza (gripe) da origen a una variación antigénica sustancial, mientras que las proteínas internas principales que suscitan respuestas inmunitarias mediadas por células T permanecen relativamente conservadas. Siguiendo esta línea de razonamiento, las nucleoproteínas del DNA deberían proporcionar una protección amplia contra otras cepas del virus influenza y, en realidad, así lo hacen (Figura 13.11). Una combinación de segmentos de DNA que codifican la hemaglutinina (incluidos sólo por cuestiones de procedimientos) y de genes de nucleoproteínas otorgaron una buena protección contra la infección a los primates no humanos y a los hurones, y protegió a éstos frente a la exposición a una cepa epidémica viral humana antigénicamente distinta de una manera más efectiva que la vacuna aprobada en la actualidad para su uso. Asimismo, la vacunación puede efectuarse cubriendo los plásmidos con partículas diminutas de oro o micropartículas catiónicas del copolímero láctido-glucólido (PLG) e introduciéndolos en las células de la piel por medio de una pistola "biolística" de helio de alta presión, técnica en la que se usa entre 10 y 100 veces menos DNA de plásmido que en la inyección intramuscular.

Hasta la fecha, la vacunación simple de DNA no ha sido tan exitosa en los primates, humanos o no humanos, como en los ratones. No obstante, las numerosas ventajas potenciales del enfoque, que incluyen su sencillez y la facilidad del control de calidad, por ejemplo, se traducen en la gran cantidad de esfuerzos que se están realizando para obtener mejoras en las vacunas de DNA para el uso en seres humanos. Uno es un protocolo de "sensibilización-refuerzo" (*prime-boost*). El nivel bajo pero persistente de expresión del antígeno proteico por las vacunas de DNA establece una

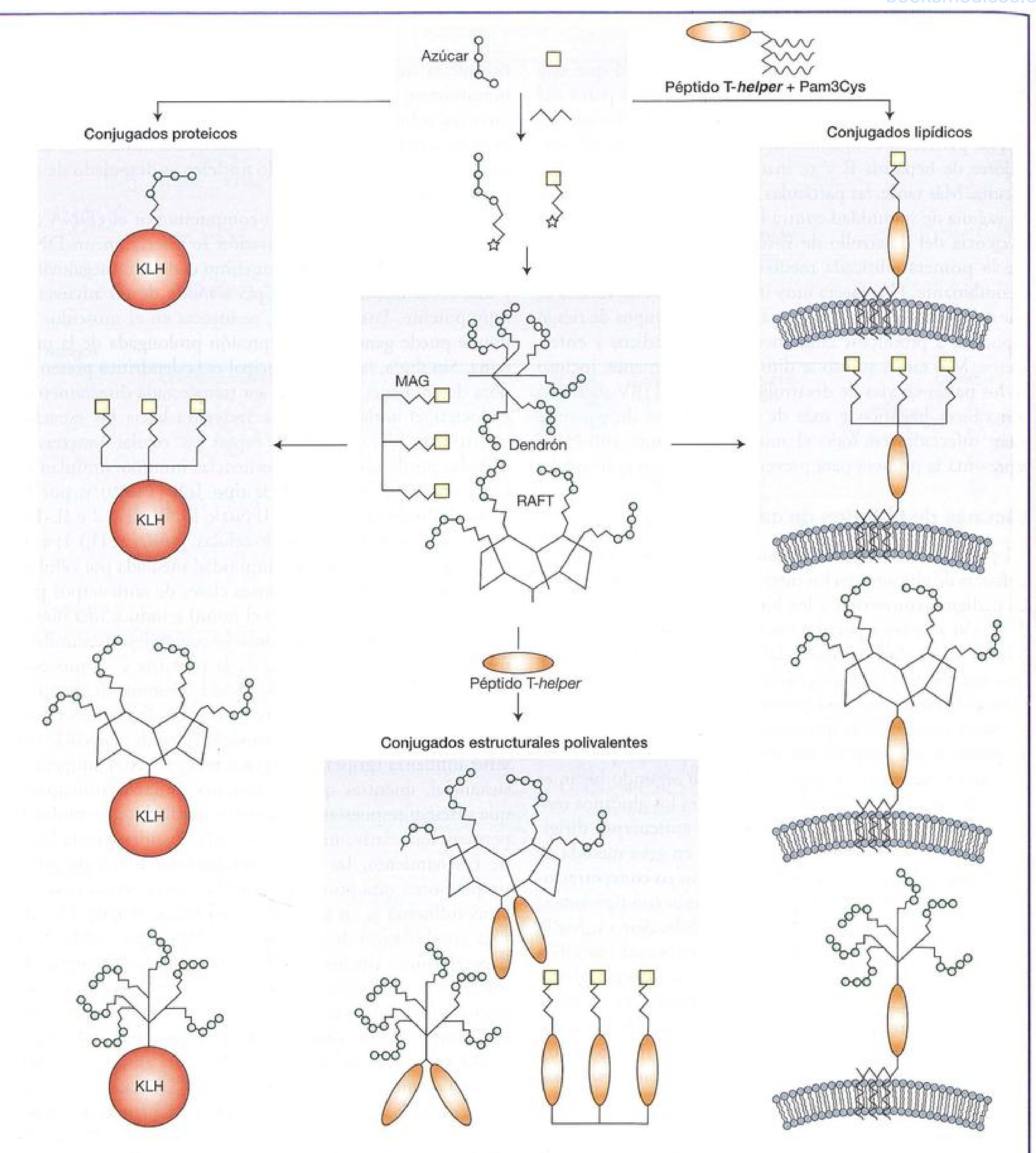


Figura 13.10. Representación esquemática del diseño de inmunógeno glucoconjugado.

Se comienza a partir de los glucanos activados (la estrella indica el grupo activado) provenientes de fuentes naturales o sintéticas; se muestra la producción de tres categorías de inmunógenos glucoconjugados: conjugados proteicos, conjugados lipídicos y conjugados estructurales polivalentes. En cada categoría se cumple el requerimiento de mostrar polivalencia y epítopos de células T, fundamentales para lograr respuestas intensas, duraderas y de cambio de clase del anticuerpo. En el caso de los conjugados proteicos, los glucanos activados están unidos de manera covalente con proteínas inmunógenas transportadoras, por ejemplo, hemocianina extraída del molusco "lapa californiana" (KLH, *keyhole limpet hemocyanin)*, que proporcionan epítopos de células T y muestran polivalencia. Los conjugados lipídicos, formados por unión covalente de glucanos activados a los péptidos de la célula T *helper* unidos a fracciones lipídicas, permiten la polivalencia a través de la formulación en las membranas lipídicas. Además, los glucanos activados pueden primero conjugarse con estructuras polivalentes sintéticas, por ejemplo, dendrón, glucopéptido antigénico múltiple (mAG, *multiple antigen glycopeptide*) y molde funcionalizado dirigido en forma regionselectiva (RAFT, *regioselectively addressable functionalized template*), que pueden ser usados después para formar conjugados proteicos y lipídicos. Como alternativa, los conjugados estructurales polivalentes pueden formarse a través del agregado de péptidos solos de las células T *helper*. Los adyuvantes (véanse más adelante) suelen estar incluidos en las formulaciones de las vacunas glucoconjugadas (p. ej., alumbre o QS-21). Obsérvese que el tripalmitoil-S-glicerilcisteinilserina (Pam$_3$Cys) tiene propiedades adyuvantes. (De Astronomo R.D. y Burton D.R. [2010] *Nature* Reviews *Drug Discovery* **9**, 308-324.)

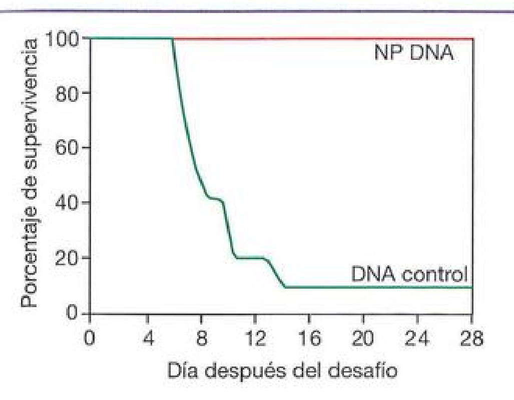


Figura 13.11. Protección por el desafío con una cepa heteróloga del virus de la gripe después de la vacunación con DNA y nucleoproteína.

Se inmunizaron ratones con tres dosis de 200 mg de nucleoproteína (NP) o un vector de DNA (control), separadas por intervalos de 3 semanas, y se los desafió con una dosis letal de una cepa heteróloga del virus de la gripe al cabo de 3 semanas de la última inmunización. La supervivencia de los ratones que recibieron DNA-NP fue significativamente mayor que la de los animales que recibieron el vector (p = 0,0005). (Datos cedidos por cortesía de la doctora Margaret A. Liu y cols. De: *DNA and Cell Biology* [1993] **12**, 777-783 y reproducidos con autorización de Mary Ann Liebert Inc.)

dotación de células B de memoria de relativamente alta afinidad que puede ser revelada con facilidad por refuerzos con el antígeno proteico (Figura 13.12). Esto ha dado lugar a una estrategia de sensibilización-refuerzo en la que estas células de memoria se expanden mediante refuerzos con un vector viral no replicante, como el virus de la viruela aviar y la cepa Ankara del virus modificado de la vacuna, que tiene un gen que codifica el antígeno. Los ratones inmunizados de este modo con la hemaglutinina del virus influenza produjeron concentraciones elevadas satisfactorias de anticuerpos IgG2a y estaban protegidos contra el desafío con el virus vivo. Es de destacar que hasta el 30% de las células T $CD8^+$ eran específicas para el epítopo inmunizante demostrado por la unión del tetrámero de clase I del CMH. Una estrategia similar con *Plasmodium berghei* produce niveles elevados de células T $CD8^+$ específicas del péptido que segregan IFNγ y que protegen contra el desafío con esporozoítos. Un ensayo en curso de vacuna anti-HIV utiliza la sensibilización con DNA seguido por un refuerzo con adenovirus, en la que ambos, la sensibilización y el refuerzo, codifican una serie de proteínas del HIV.

Enfoques más nuevos para el desarrollo de vacunas

Las vacunas convencionales, que han tenido enorme éxito contra una amplia gama de agentes patógenos, pueden describirse como seguidoras de una estrategia de "mimetismo simple" que se remonta a los trabajos de Jenner y Pasteur. La estrategia esencial consiste en utilizar patógenos atenuados o muertos, con el uso ocasional de subunidades purificados o recombinantes. Estas vacunas se dirigen sobre todo contra patógenos que tienen muy poca diversidad antigénica y parecen depender en gran medida de la protección basada en anticuerpos. La tendencia del enfoque convencional fue mucho menos exitosa para una gama de otros agentes patógenos, en especial los que muestran una diversidad antigénica considerable o en los que la inmunidad de células T puede ser de mayor importancia protectora (Figura 13.13). Por ejemplo, considérese el HIV. Una vacuna con virus vivos atenuados protege a los monos contra el desafío con la misma cepa de SIV (virus de la inmunodeficiencia simiana, el equivalente en los monos del HIV), pero es mucho menos eficaz contra otras cepas de SIV. Está claro que para que una vacuna contra el HIV sea eficaz debe proteger contra la mayoría de las cepas virales globales circulantes. Las vacunas con virus muertos y de subunidades contra VIH/SIV tienden a ser ineficaces debido a la enorme variabilidad e inestabilidad de las proteínas de la envoltura de superficie (véase también el Capítulo 14). Otra enfermedad muy problemática para el desarrollo de una vacuna es la tuberculosis; es probable que la inmunidad contra este patógeno intracelular involucre las actividades protectoras de las células T en lugar de la inmunidad basada en anticuerpos.

En los últimos años, el desarrollo de vacunas se ha convertido cada vez más en una herramienta de la biología molecu-

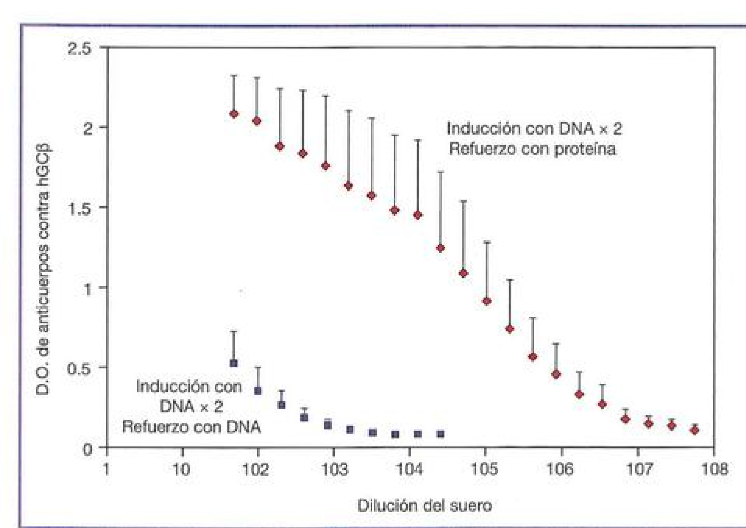


Figura 13.12. Inducción de células de memoria por una vacuna de DNA y refuerzo en la producción de anticuerpos con la proteína inmunógena, la gonadotropina coriónica humana β (hGCβ).

Cada grupo de cinco ratones C57BL/6 × BALB/c) F1 recibió 50 mg del plásmido de DNA hGC β en las semanas 0 y 2; un grupo recibió una inyección adicional del plásmido, mientras que al otro se le administró un refuerzo con 5 mg del antígeno proteico de hGC β en adyuvante RIBI. Se probaron diluciones de suero para evaluar anticuerpos contra hGC β mediante técnicas de ELISA indirecta. Se muestra la media de los títulos + error estándar. (Datos de Laylor R. y col. [1999] *Clinical and Experimental Immunology* **117**, 106.)

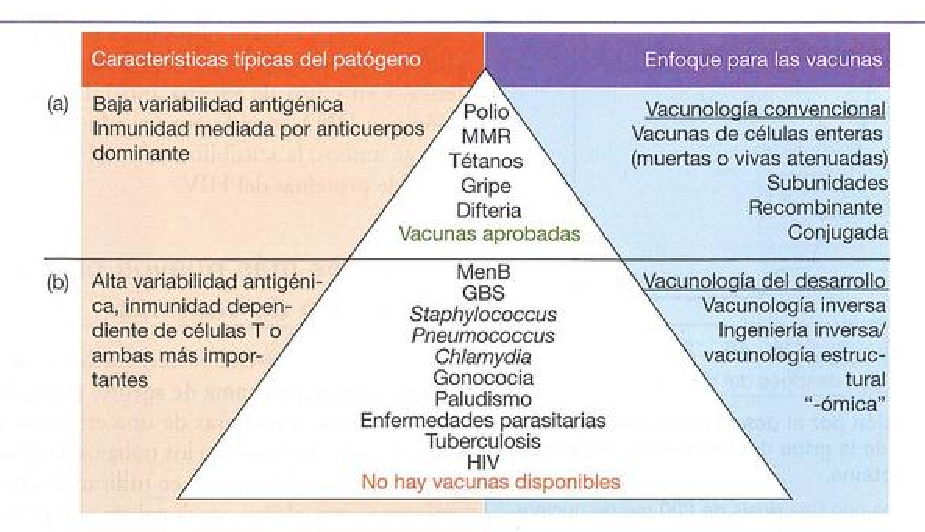


Figura 13.13. Esquema de la vacunología convencional y la vacunología del desarrollo en la era posgenómica.

a) Caso todas las vacunas aprobadas están dirigidas contra patógenos que tienen baja variabilidad antigénica y en los que la protección depende de la inmunidad mediada por anticuerpos. De modo típico, estas vacunas se han desarrollado mediante el uso de la vacunología convencional. b) Se muestran varios patógenos para los cuales no se dispone de vacunas, debido ya sea a su alta variabilidad antigénica o a la necesidad de inducir inmunidad dependiente de células T para obtener protección. Se están aplicando enfoques nuevos para el desarrollo de vacunas contra estos patógenos en la era posgenómica. Las vacunas o las enfermedades mostradas en la figura son ejemplos seleccionados de cada categoría y el listado no es completo. TB, *Mycobacterium tuberculosis;* MMR, sarampión, parotiditis, rubéola; MenB, meningitis B; GBS, *Streptococcus* del grupo B. (Figura con autorización de Rinuado C.D., Telford J.L., Rappuoli R. y Seib K.L. [2009] *Journal of Clinical Investigation* **9**, 2515 2525 y modificada.)

Cuadro 13.3. Vacunas autorizadas actualmente para su uso en los Estados Unidos y Europa.

Vacuna	Componente antigénico	Uso
Infecciones bacterianas (+ virales en algunas combinaciones)		
Carbunco	Antígeno protector de *B. anthracis* adsorbido en alumbre	Personas que manipulan animales o sus productos infectados. Personal de laboratorio que trabaja con *Bacillus anthracis*
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin, cepa viva atenuada de *Mycobacterium bovis*	Niños y adolescentes en regiones geográficas donde se demostró la eficacia de la vacuna, incluso en el Reino Unido. No se utiliza de manera sistemática en los Estados Unidos
Cólera	*Vibrio cholerae* inactivado junto con la subunidad B recombinante de la toxina del cólera	Vacuna oral bebible para viajeros a regiones endémicas o epidémicas
Difteria, tétanos, pertussis, poliomielitis, hepatitis B	Toxoide diftérico, toxoide tetánico, pertussis acelular, virus de la poliomielitis inactivado y antígeno de superficie recombinante del virus de la hepatitis B, adsorbidos en alumbre	Inmunización sistemática de niños
Difteria, tétanos, pertussis, poliomielitis, *Haemophilus influenzae* tipo b	Otra vacuna combinada pentavalente, como polisacáridos capsulares de *Haemophilus influenzae* tipo b conjugados con toxoide tetánico o la variante no tóxica CRM 197 de la toxina diftérica	Inmunización sistemática de niños

Cuadro 13.3. Vacunas autorizadas actualmente para su uso en los Estados Unidos y Europa. *(Continuación)*

Vacuna	Componente antigénico	Uso
Meningocócica del grupo C	Cuatro serotipos de polisacárido del meningococo conjugados con toxoide diftérico	Inmunización sistemática de niños en el Reino Unido. Como casi todos los casos de enfermedad meningocócica de la niñez en el Reino Unido son causados por los grupos B y C, la vacuna usada para la inmunización sistemática contiene sólo el grupo C. También se dispone de una vacuna contra los grupos de meningococos A, C, W-135 e Y
Neumocócica	Polisacárido de cada uno de los 23 o de cada uno de los 7 tipos capsulares de neumococos, conjugado con toxoide diftérico y adsorbido en alumbre	Inmunización sistemática de niños (Estados Unidos). Individuos en riesgo de infección neumocócica, por ejemplo, ancianos y personas con esplenectomía o con diversas enfermedades crónicas (Reino Unido)
Fiebre tifoidea	Antígeno polisacárido Vi de *Salmonella typhi*	Viajeros a países con condiciones sanitarias deficientes, personal de laboratorio que manipula muestras de casos sospechosos
Infecciones virales		
Hepatitis A	Virus de la hepatitis A inactivado adsorbido en alumbre	Individuos en riesgo, por ejemplo, personal de laboratorio que trabaja con el virus, pacientes con hemofilia, viajeros a áreas de alto riesgo
Hepatitis B	Antígeno de superficie recombinante del virus de la hepatitis B (HBsAg) adsorbido en alumbre	Inmunización sistemática de niños (Estados Unidos). Individuos en alto riesgo de contraer hepatitis B (Reino Unido)
Gripe (virus inactivados)	Cepas trivalentes inactivadas recomendadas por la OMS del virus influenza	Inmunización sistemática de lactantes (Estados Unidos).
Gripe (vivos atenuados)	Cepas trivalentes atenuadas recomendadas por la OMS del virus influenza	Individuos con alto riesgo de complicaciones al contraer el virus influenza (Reino Unido)
Virus de la encefalitis japonesa	Virus inactivado de la encefalitis japonesa	Personas de 5 a 49 años con alto riesgo de complicaciones al contraer el virus influenza
Sarampión, parotiditis y rubéola (MMR)	Virus vivos atenuados de sarampión, parotiditis y rubéola	Personas en riesgo de contraer el virus de la encefalitis japonesa
Papilomavirus	Partículas similares a virus	Inmunización sistemática de niños
Poliomielitis (virus inactivados, Salk)	Poliovirus inactivados tipos 1, 2 y 3	Profilaxis contra infecciones por el papilomavirus humano (HPV), que incluye la prevención del cáncer de cuello uterino Inmunización sistemática de niños. Protege contra la parálisis por poliomielitis pero no evita la diseminación del virus silvestre (para lo cual se administra la vacuna antipoliomielítica oral [Sabin] que contiene virus atenuados de los tipos 1, 2 y 3)
Rabia	Virus inactivados de la rabia	En individuos de riesgo
Rotavirus	Virus vivos atenuados	Oral, para prevenir la diarrea asociada con el rotavirus y la deshidratación de lactantes
Encefalitis transmitida por garrapatas	Virus inactivados de la encefalitis transmitida por garrapatas	En individuos de riesgo, por ejemplo, los que trabajan, transitan o acampan en áreas infectadas
Varicela-zóster	Virus vivos atenuados varicela-zóster	Niños sanos seronegativos mayores de 1 año que entran en contacto estrecho con individuos de riesgo alto de infecciones graves por varicela. Personal sanitario seronegativo que entra en contacto directo con pacientes
Fiebre amarilla	Virus vivos atenuados de fiebre amarilla	Personas que viajan o viven en áreas donde la infección es endémica y personal de laboratorio que manipula virus o muestras clínicas de casos sospechosos

También están autorizadas las vacunas que contienen componentes individuales de las vacunas polivalentes.

lar moderna. En el caso de las vacunas bacterianas, el aumento de la genómica ha sido crucial. En la actualidad, se dispone de al menos una secuencia completa para todos los patógenos humanos principales. Esto ha facilitado el desarrollo de la "vacunología inversa", patrocinado por Rino Rappuoli y cols. La estrategia esencial identifica el repertorio completo de antígenos de la superficie bacteriana, investiga la capacidad de los antígenos de inducir inmunidad en modelos animales y, a continuación, se diseña una combinación de antígenos para ser utilizada en la vacuna. Este enfoque sofisticado se ilustra en la Figura 13.14 para el desarrollo de una vacuna satisfactoria contra *Neisseria meningitidis* serogrupo B (MenB), que es la causa más común de enfermedad meningocócica en el mundo desarrollado y ha definido los enfoques convencionales de vacunas durante décadas.

Los virus altamente variables como el HIV y el de la hepatitis C (HCV) también proporcionan intensos problemas para el desarrollo de vacunas. Aquí, uno de los enfoques adoptados puede describirse como ingeniería genética inversa o vacunología estructural. Así, se describieron anticuerpos con capacidad neutralizante muy amplia que pueden actuar contra un gran espectro de aislamientos globales, como lo exige una vacuna, en la infección natural y se están estudiando en términos de su interacción con las proteínas de la envoltura de superficie. La idea es que la información molecular obtenida pueda utilizarse para modificar las proteínas de envoltura o diseñar nuevos inmunógenos que puedan usarse como vacunas para obtener anticuerpos con amplia capacidad neutralizante. Este mismo concepto podría proporcionar una vacuna antigripal universal que pudiera proteger contra la mayoría o todos los subtipos y cepas del virus y obviar la necesidad de la vacunación anual. La inmunodominancia es uno de los grandes problemas en el desarrollo de vacunas contra patógenos muy variables, es decir, el patógeno ha evolucionado de modo que tiendan a inducirse respuestas inmunitarias más fuertes contra las regiones más variables del agente patógeno. En la actualidad, se está estudiando una serie de estrategias para tratar de centrar las respuestas de células B y T en los epítopos más conservados.

Vacunas actuales

En los Cuadros 13.3 y 13.4 se muestran las vacunas establecidas para el uso actual y los esquemas de administración. Las diferencias regionales en los esquemas de inmunización no sólo reflejan grados distintos de riesgo percibido de infección, sino también otras consideraciones locales. Los niños menores de 2 años de edad presentan respuestas inadecuadas al polisacárido capsular timoindependiente de *H. influenzae*, de modo que en la actualidad se los inmuniza de manera sistemática con el antígeno conjugado con toxoide tetánico o la variante no tóxica CRM197 de la toxina diftérica. La considerable morbimortalidad asociada con la infección por el virus de la hepatitis B, su epidemiología compleja y la dificultad de identificar a los individuos de alto riesgo condujeron a la vacunación de rutina de los recién nacidos en los Estados Unidos. En el Reino Unido, se administra la vacuna con BCG en forma sistemática como profilaxis de la tuberculosis. Sin embargo, éste no es el caso en los Estados Unidos, donde se considera una desventaja importante ya que, como la vacunación determina que los individuos se tornen positivos a la prueba intradérmica de Mantoux, es imposible utilizarla como un medio para descartar la tuberculosis durante la investigación de sospecha de infección. Debido a la deriva antigénica constante y al cambio antigénico ocasional que se producen con el virus influenza, todos los años debe elaborarse una vacuna antigripal nueva en cada hemisferio.

Vacunas en etapa experimental

Como sucede con los agentes farmacéuticos, el desarrollo de vacunas comprende varias etapas. Los estudios preclínicos favorables en modelos animales son seguidos por los ensayos clínicos de fase I en voluntarios, a fin de evaluar inicialmente la seguridad y la respuesta inmunitaria. Si todo funciona bien, se llevan a cabo los ensayos de fase II en un número pequeño de individuos para obtener un indicio acerca de la eficacia. Si el ensayo de fase II tiene éxito y el laboratorio y las autoridades reguladoras deciden continuar, se realiza un estudio mucho más grande (fase III) para corroborar la eficacia y la seguridad, tras lo cual se otorga la aprobación reguladora para la distribución. Por último, los ensayos clínicos de fase IV establecen la eficacia y la seguridad en un número importante de personas. Este proceso completo puede demandar hasta 20 años y la inversión de más de quinientos millones de dólares.

En la actualidad, hay muchas vacunas en etapa experimental para enfermedades en las que no existe ninguna vacuna o en las que las vacunas disponibles son deficientes (Cuadro 13.5). La **tuberculosis** es un buen ejemplo de esta última situación. La vacuna elaborada con bacilos de Calmette-Guérin (BCG) se utilizó durante más de 80 años, pero sólo fue eficaz para proteger a niños y adolescentes contra la tuberculosis diseminada y meníngea, y por lo tanto, sólo en algunas áreas del mundo, y es en gran parte ineficaz contra la tuberculosis pulmonar que representa la forma más común de la enfermedad en los adultos. En realidad, esta enfermedad sigue siendo un problema de salud verdaderamente importante en los países en vías de desarrollo, y los casos también han aumentado de manera notable en los países occidentales. El incremento de la susceptibilidad a la tuberculosis en los pacientes con HIV/sida es alarmante y llevó a que la mitad de los infectados por HIV padeciera la enfermedad, y están surgiendo en todo el mundo cepas con resistencia a múltiples fármacos. Esto ha llevado a una investigación urgente para obtener mejores candidatos de las vacunas.

Las vacunas contra enfermedades parasitarias mostraron dificultades particulares para su desarrollo: paludismo

El principal adelanto en el control del paludismo fue el hallazgo de que la impregnación con un insecticida piretroide de los tules utilizados como mosquiteros de las camas reduce la mortalidad por *Plasmodium falciparum* en un

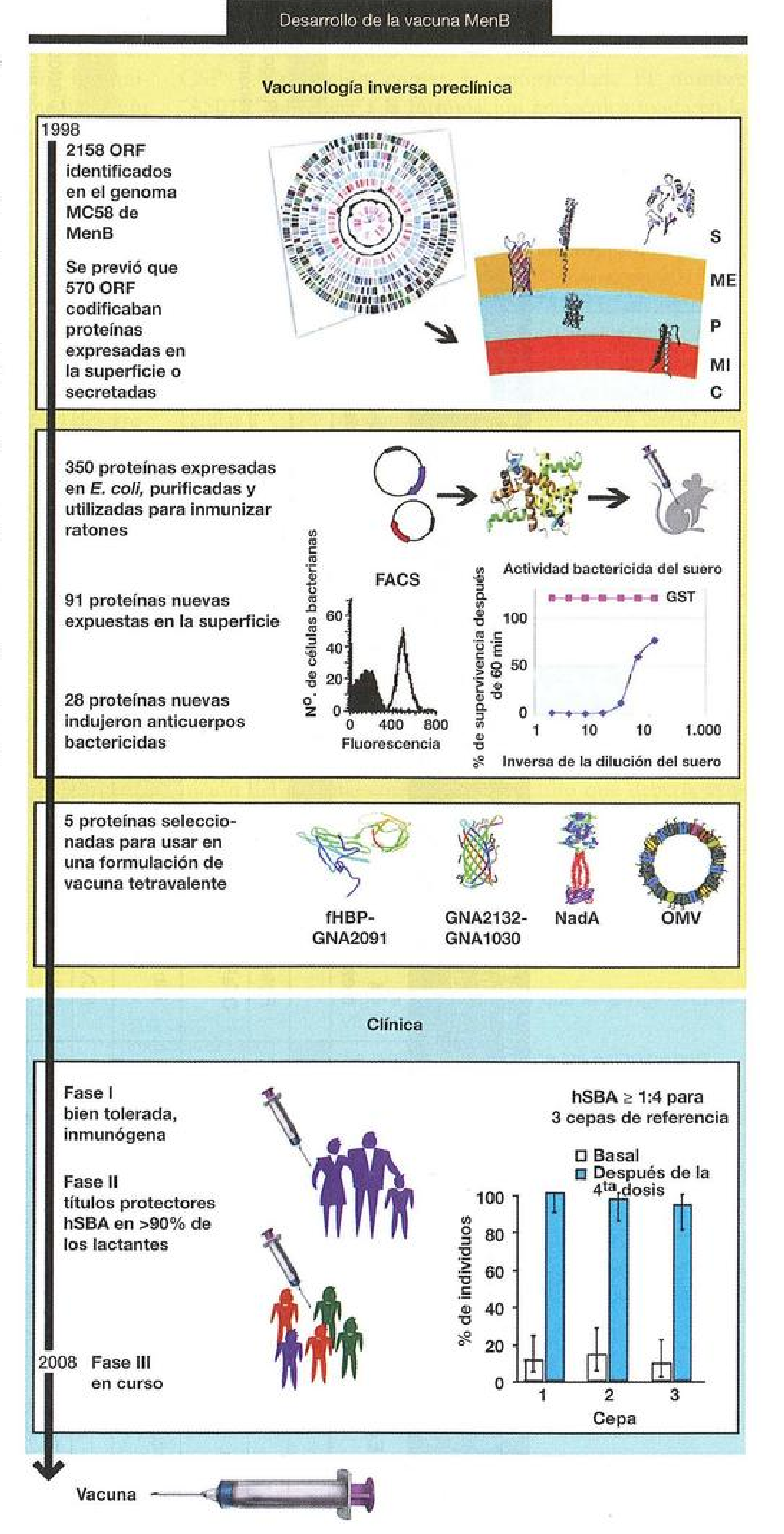


Figura 13.14. Desarrollo de la vacuna MenB.

El desarrollo preclínico se basó en el enfoque de la vacunología inversa, en el cual se utiliza la secuencia del genoma de la cepa MC58 del microorganismo virulento de la meningitis B (MenB) usada para identificar los marcos de lectura abiertos (ORF; *open reading frames*) que se postula que codifican las proteínas que estaban expuestas en la superficie (es decir, secretadas [S] o localizadas en la membrana externa [ME]), que fueron después expresadas en *E. coli,* purificadas y utilizadas para inmunizar a ratones. Más tarde, se utilizaron los anticuerpos generados en ratones para confirmar la exposición de la superficie de la vacuna candidata por FACS y para identificar proteínas que indujeron actividad bactericida. Este proceso de cribado dio como resultado la identificación de varios candidatos nuevos como vacuna, que comprenden GNA 1870 (que es fHBP), GNA 1994 (que es NadA), GNA2132, GNA 1030 y GNA2091. La formulación para la vacuna MenB global consta de cuatro componentes: proteínas de fusión fHBPGNA2091 y GNA2132-GNA1030, NadA y OMV de la cepa de la vacuna MeNZB Nueva Zelanda. El desarrollo clínico con esta formulación mostró en los ensayos clínicos de fases I y II que la vacuna es bien tolerada y es inmunógena. La vacuna indujo actividad bactericida al usar complemento humano (hSBA) con títulos mayores de 1:4, lo cual indica la generación de anticuerpos capaces de matar las bacterias al nivel que se correlaciona con la protección contra las bacterias en más del 90% de los lactantes después de la cuarta dosis. Esta vacuna ingresó en los ensayos clínicos de fase III en 2008. P, periplasma; MI, membrana interna; C. citoplasma. (Figura con autorización de Rinuado C.D., Telford J.L., Rappuoli R. y Seib K.L.([2009] *Journal of Clinical Investigation* ***9***, 2515-2525.)

Cuadro 13.4. Esquemas de inmunización recomendados para personas de 0 a 6 años por los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) en los Estados Unidos, 2008. Se muestran los rangos cuando hay flexibilidad en el esquema de inmunización, p. ej., para HepB, la primera inmunización se administra al nacer, la segunda a 1-2 meses y la tercera a 6-18 meses. (http://www.cdc.gov/vaccines/recs/schedules/default.htm)

Vacuna ▼ / Edad ►	Al nacer	1 mes	2 mes	4 mes	6 mes	12 mes	15 mes	18 mes	19-23 mes	2-3 años	4-6 años
Hepatitis B	HepB	HepB			HepB						
Rotavirus			Rota	Rota	Rota						
Difteria, tétanos, pertussis			DTaP	DTaP	DTaP		DTaP				DTaP
Haemophilus influenzae tipo b (Hib)			Hib	Hib	Hib	Hib					
Neumocócica			PCV	PCV	PCV	PCV				PPV	
Poliovirus inactivado (IPV)			IPV	IPV	IPV						IPV
Influenza					Influenza (anual)						
Sarampión, parotiditis y rubéola (MMR)						MMR					MMR
Varicela						Varicela					Varicela
Hepatitis A						HepA (2 dosis)				Series HepA	
Meningocócica										MCV4	

Rango de edades recomendadas

Ciertos grupos de alto riesgo

40%. Sin embargo, con la aparición de cepas de mosquito resistentes al producto químico se hace necesario desarrollar vacunas. El objetivo se puede alcanzar porque, si bien los niños son muy susceptibles, los adultos que residen en regiones con endemicidad elevada adquieren una inmunidad protectora pero no esterilizante, tal vez mediada por anticuerpos específicos.

El paludismo es una enfermedad parasitaria compleja transmitida por un mosquito (Figura 13.15). Tradicionalmente, las vacunas se han dirigido a un único estadio del ciclo infeccioso. El ciclo incluye el estadio de esporozoíto, que es la forma infectante inicial para el huésped después de la picadura del mosquito, el estadio hepático de infección, el estadio hemático en el que los eritrocitos se infectan y el estadio de transmisión en el que los gametos son tomados por el mosquito para completar el ciclo. Uno de los problemas con el que se enfrentaron los investigadores al desarrollar una vacuna es la considerable variación, muy evidente en las proteínas palúdicas.

En 2008 se informó que una vacuna candidata –RTS,S /AS01E (Glaxo-SmithKline, GSK)– redujo la incidencia de casos de paludismo clínico a cerca de la mitad en un ensayo de alrededor de 800 niños de 5 a 17 meses en Kenia y Tanzania, en una única estación de paludismo. Así, hubo un único episodio de paludismo grave en el grupo que recibió la vacuna, pero ocho episodios entre los siete niños del grupo que recibió placebo. Este éxito moderado fue aclamado como un hito importante en el camino hacia una vacuna eficaz contra el paludismo, ya que los niños en el grupo etario de 0-5 años en África subsahariana son precisamente la mayoría demográfica en riesgo por la enfermedad grave debida al parásito. La vacuna estimula respuestas inmunitarias contra la proteína del circunesporozoíto (CSP) de *Plasmodium falciparum* en el estadio de infección hepática. La vacuna induce anticuerpos anti-CSP, pero no se encontró correlación alguna entre las concentraciones de anti-CSP y protección contra la enfermedad. El nombre "AS01E" se refiere a la formulación antigénica usada en la vacuna. La etapa siguiente en el desarrollo de la vacuna es un ensayo clínico de fase III en el que participan hasta 16.000 niños africanos en 7 países. El ensayo se inició en mayo de 2009, los datos estarán disponibles para las autoridades reguladoras en 2012 y la vacuna disponible para su uso específico entre los niños de 5 a 17 meses, en 2013.

A pesar del éxito modesto de RTS,S/AS01E, un argumento firme es que, con probabilidad, la vacuna más eficaz sea aquella dirigida a muchos antígenos en diferentes estadios del ciclo vital del parásito. Por ejemplo, se señaló que las células T CD8+ pueden proporcionar protección estéril contra los parásitos del estadio hepático del paludismo en ratones. Sin embargo, la cantidad de células T CD8+ específicas para el antígeno es muy alta, lo que sugiere que podría ser imprudente depender sólo de este mecanismo. Han surgido datos alentadores con la combinación de respuestas inmunitarias contra los estadios hepático y hemático del parásito, sobre todo mediante vectores virales que pueden inducir anticuerpos eficaces y respuestas de células T. Además, datos en seres humanos y ratones sugieren que la transmisión de anticuerpos bloqueadores puede ser beneficiosa.

Una de las posibilidades más prometedoras para la investigación de la vacuna contra el paludismo se refiere a la definición del genoma completo del parásito que debería ayudar a identificar más sitios de acción específicos, como se describió antes para la "vacunología inversa". Las vacunas

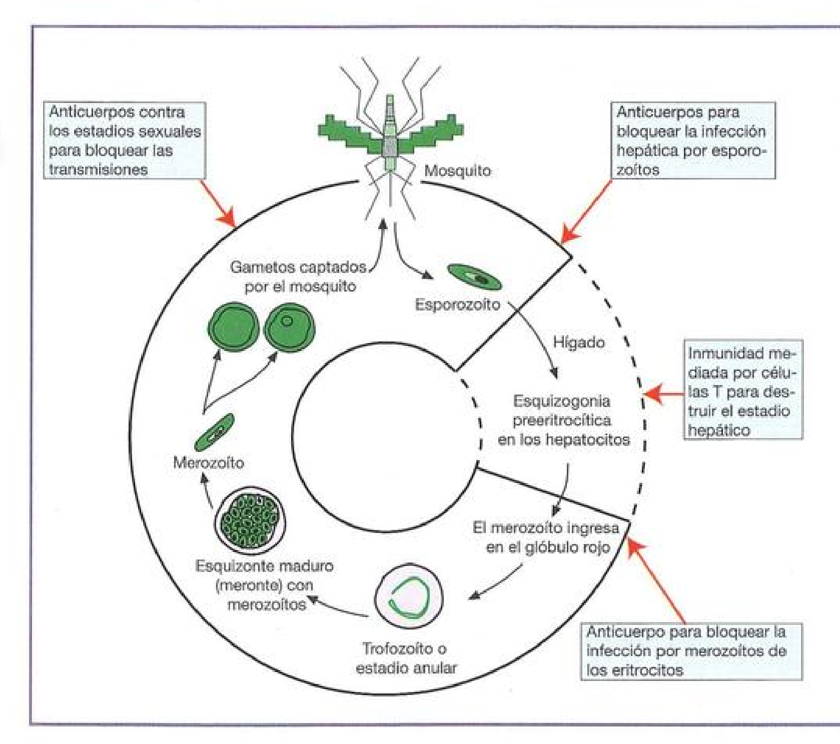


Figura 13.15. Vacuna que se dirige al ciclo vital del paludismo.

Se muestran algunos de los estadios más investigados del ciclo que pueden ser sitios posibles de acción de la vacuna.

Cuadro 13.5. Adyuvantes en desarrollo para vacunas humanas. De Reed S.G. y cols. (2008) *Trends in Immunology* **30**, 23-32.

Adyuvantes en desarrollo para vacunas humanas

Adyuvantes	Formulación	En ensayos preclínicos o clínicos
Montanides	Emulsiones de agua en aceite	Paludismo (Fase I), HIV, cáncer (Fase I/II)
Saponinas (QS-21)	Acuosa	Cáncer (Fase II), herpes (Fase I), HIV (Fase I)
SAF	Emulsión de aceite en agua que contiene escualeno, Tween® 80, Pluronic® L121	HIV (Fase I - Chiron)
AS03	Emulsión de aceite en agua que contiene α-tocoferol, escualeno, Tween™ 80	Gripe pandémica (GSK)
MTP-PtdEtn	Emulsión de aceite en agua	HSV
Exotoxinas	*P. aeruginosa*	*P. aeruginosa*, fibrosis quística (AERUGEN - Crucell/Berna) ETEC (Fase II - Iornai Corp.)
ISCOMS	Enterotoxina LT *termolábil de E. coli*	Influenza, HSV, HIV, HBV, paludismo, cáncer
Ligandos TLR		
MPL –SE	Fosfolípidos, colesterol, QS-21	*Leishmania* (Fase I/II - IDRI)
Lípido A sintético	Emulsión de aceite en agua	Varias indicaciones (Avanti/IDRI)
MPL®-AF	Emulsión de aceite en agua	Alergia (ATL); cáncer (Biomira)
AS01	Acuosa	HIV (Fase I), paludismo (ASO1, Fase III, GSK), cáncer (Fase II/III, Biomira/MerckKGaA)
AS02	Liposómica	HPV (Cervarix), HIV, tuberculosis, paludismo (Fase III), herpes (GSK)
ASO4	Emulsión de aceite en agua que contiene MPL® y QS-21	HPV, HAV (GSK)
AS15	Alum + MPL® acuoso	Terapia contra el cáncer (GSK)
RC529	AS01 + CpG	HBV, pneumovax
TLR-9	Acuosa	Cáncer (ProMune - Coley/Pfizer)
(CpG)	n/d	HCV (ACTILON Coley) HIV, HBV, HSV, carbunco (VaxImmune Coley/GSK/Chiron) HBV (HEPLISAV, Fase III - Dynavax)
Serie TLR-9 ISS	n/d	Cáncer (Fase II, Dynavax)
Serie TLR-9 IMO	n/d	Cáncer (IMOxine, Fase I, Hybridon Inc.)
(YpG, motivo CpR)	n/d	Cáncer (IMO-2055, Fase II, Idera Pharm.) HIV (Remune, Fase I, Idera/IMNR)
TLR-9 agonista (MIDGE®)	n/d	Cáncer (Fase I, Mologen AG)
TLR-7/8 (Imiquimod)	n/d	Melanoma (3M Pharmaceutical) HIV (preclínico), leishmaniasis
TLR-7/8 (Resiquimod)	n/d	HSV, HCV (Fase II - 3M Pharmaceuticals)

Abreviaturas: ETEC, *Escherichia coli* enterotoxigénica; HBV, virus de hepatitis B; HCV, virus de hepatitis C; HPV, papillomavirus humano; HSV, virus herpes simple; n/d, no disponible.

antipalúdicas basadas en el parásito entero, por ejemplo esporozoítos irradiados, son una alternativa de vacunas recombinantes que están siendo investigadas.

Por último, debe señalarse que, como sucede con varias infecciones virales, es posible que la inmunidad mediada por células T pueda contribuir a la patología del paludismo. Se observaron infiltrados de leucocitos en cerebros de pacientes que fallecieron por paludismo cerebral y la resistencia a la enfermedad se correlacionó, en ciertos casos, con la deficiencia de la función de las células T.

Vacunas para la protección contra el bioterrorismo

La guerra biológica tiene una historia larga y oscura. Un ejemplo temprano se produjo en 1346, cuando los tártaros catapultaron cuerpos y cabezas infectados por peste en las paredes de la ciudad de Kaffa, en la ribera del Mar Negro, en un intento por recapturar el pueblo de los genoveses. En 1763, en la lucha de los británicos con los indios Delaware y como un gesto supuesto de "buena voluntad", les obsequiaron mantas contaminadas con el virus de la viruela, lo que resultó en la aniquilación de muchas tribus nativas. Durante el siglo pasado, diversos países a lo largo del mundo disponían de programas con armas biológicos. Particularmente alarmantes para los ciudadanos estadounidenses fueron los casos de carbunco que aparecieron a fines de 2001 tras la exposición de artículos enviados deliberadamente por correo, contaminados con esporas y enviados a las oficinas de medios de comunicación en la ciudad de Nueva York y Boca Raton, Florida, y a dos senadores estadounidenses en la ciudad de Washington. Aparte del carbunco (*Bacillus anthracis*), la viruela y la peste (*Yersinia pestis*) mencionados antes, es posible utilizar otros agentes infecciosos para el bioterrorismo, como la toxina de *Clostridium botulinum* (botulismo), *Francisella tularensis* (tularemia) y los virus de las fiebres hemorrágicas de Ébola, Marburg, Lassa y de Sudamérica. Por consiguiente, se están realizando intentos para elaborar vacunas contra esas enfermedades en aquellos casos en los que no se dispone en la actualidad de preparados eficaces.

Se observó un éxito considerable en el Centro de Investigación de Vacunas de los *National Institutes of Health in Bethesda*, Maryland, Estados Unidos, en el desarrollo de una vacuna que protege a los monos contra el desafío letal del virus de Ébola. La vacuna utiliza adenovirus no replicantes como vector para la introducción de genes de virus de Ébola y la expresión de las proteínas del virus de Ébola en los animales antes de su exposición. Tras la erradicación de la viruela, se suspendió la vacunación sistemática contra la enfermedad. La preocupación de que el virus pudiera usarse como un arma biológica condujo a reclamar la reintroducción de la vacunación sistemática. Actualmente, sólo un número pequeño de investigadores de laboratorio, personal de salud clave y miembros de las fuerzas armadas son vacunados porque se considera que la vacunación de toda la población llevaría inevitablemente a un número pequeño de muertes relacionadas con la vacuna, lo cual es aceptable en el caso de una enfermedad endémica, pero no para una enfermedad ya "erradicada". Sin embargo, se está realizando un acopio de vacuna por si fuera necesario. Como dato accesorio, la vacunación contra la viruela también protegería contra el virus relacionado de la viruela simiana.

Inmunización contra el cáncer

Por el conocimiento de que varios tipos diferentes de cáncer están estrechamente asociados con agentes infecciosos, es obvio que sugiera que la vacunación contra agentes como el papilomavirus humano (cáncer de cuello uterino), el virus de Epstein-Barr (linfoma de Burkitt y otros linfomas, carcinomas nasofaríngeos), *Helicobacter pylori* (cáncer de estómago), virus de la hepatitis B (cáncer hepático), HTLV-1 (leucemia de células T del adulto) y herpesvirus humano 8 (sarcoma de Kaposi) producirá reducciones sustanciales en la incidencia de esos tumores. También se han desarrollado vacunas contra varios antígenos asociados con tumores, como el antígeno carcinoembrionario (cáncer colorrectal), idiotipos de inmunoglobulina (linfoma de células B), MAGE (melanoma) y otros. Hasta la fecha, los resultados con antígenos propios asociados con tumores han sido poco alentadores, pero hay esperanzas de que ciertas estrategias, como la activación dirigida de células dendríticas, conduzcan a índices de respuesta más altos.

Otras aplicaciones de las vacunas

Una vacuna basada en la hormona gonadotropina coriónica humana, que se elabora mediante la preimplantación del blastocisto y resulta esencial para el establecimiento temprano del embarazo, es probada en la actualidad como anticonceptivo inmunológico. También se están desarrollando vacunas para el tratamiento de alergias y enfermedades autoinmunitarias. Éstas suelen tener como objetivo reponer el equilibrio Th1/Th2, activar las células T reguladoras o restablecer la tolerancia por deleción clonal o anergia. Una vacuna para el tratamiento de la adicción al tabaco consiste en nicotina acoplada a la proteína Qb del bacteriófago que se ensambla en un complejo de 180 monómeros proteicos para formar partículas similares a virus (VLP). La vacuna demostró su posible eficacia en un ensayo clínico en el que se observó en algunos individuos una correlación firme entre las concentraciones de anticuerpos inducidos contra la nicotina y la abstinencia continua de fumar. También se encuentra en la etapa de ensayos clínicos una vacuna anticocaína, que consiste en un derivado de la cocaína conjugado con la toxina recombinante B del cólera con adyuvante de alumbre.

Adyuvantes

La inmunización profiláctica, por razones económicas y prácticas, debe comprender un número mínimo de inyecciones y la menor cantidad posible de antígeno. Al respecto, nos hemos referido a las indudables ventajas de la replicación de microorganismos atenuados, pero los microorganismos

muertos, y en especial los productos purificados, requieren con frecuencia un adyuvante (del latín *adjuvare*, ayudar), que por definición es una sustancia incorporada al antígeno, o inyectada simultáneamente con éste, que potencia la respuesta inmunitaria.

En los adyuvantes se describen dos tipos de acciones: **inmunoestimulación** y **provisión del antígeno.** La inmunoestimulación se produce por la acción de moléculas para aumentar en forma directa las respuestas inmunitarias. Los inmunoestimulantes incluyen los agonistas del receptor de tipo Toll (TLR), las citocinas y las exotoxinas bacterianas. La explosión de conocimientos sobre la inmunidad innata en la última década aumentó de manera considerable la posibilidad del diseño racional de inmunoestimulantes. La activación de las células dendríticas es especialmente importante aquí, ya que lleva a un aumento en la captación del antígeno, la migración a los ganglios linfáticos y el cebado de las células T $CD4^+$ que colaboran en las respuestas de las células B y T. Los vehículos para la provisión del antígeno sirven para presentar éstos en forma óptima al sistema inmunitario al evitar, al menos en parte, la dispersión del antígeno y al facilitar la liberación lenta del antígeno ("efectos de depósito"). Estos vehículos pueden proporcionar no sólo el antígeno, sino también los inmunoestimulantes de modo más eficaz. Como ejemplos se mencionan las sales minerales, como el alumbre, las emulsiones como el adyuvante de Freund, los liposomas y los complejos inmunoestimulantes o ISCOM. En realidad, muchos adyuvantes combinan en grados variados las propiedades de inmunoestimulación y provisión del antígeno.

Como se mencionó, las vacunas convencionales con microorganismos vivos atenuados no requieren adyuvantes, aunque las respuestas a veces pueden mejorarse por el agregado de éstos como sucede, por ejemplo, en las vacunas contra la hepatitis A. Sin embargo, la inmunogenicidad de las proteínas suele ser relativamente pobre y es necesario el uso de adyuvantes. Esto es particularmente cierto si la proteína se presenta como una forma monomérica soluble, como la gp120 del HIV, en lugar de una forma de partículas con repeticiones multimérica, como el antígeno de superficie del HVB. Los adyuvantes más ampliamente utilizados en los seres humanos se basan en geles formados por sales de aluminio y se denominan, en conjunto, como **adyuvantes de "alumbre"**. Los antígenos son adsorbidos en las partículas de aluminio, y la formulación adecuada del adyuvante se selecciona sobre la base de la inmunogenicidad. La actividad del alumbre se atribuye a los efectos de depósito y a los efectos inmunoestimulantes basados en la formación de partículas y la inducción de inflamación. El alumbre se utiliza en varias vacunas autorizadas, como las dirigidas contra la hepatitis A, el virus del papiloma humano (HPV), la DPT (difteria-pertussis-tétanos), la antipoliomielítica con virus inactivados y contra la *Haemophilus influenzae* b.

Las **emulsiones** se utilizaron mucho en la investigación de vacunas y comienzan a aparecer en el uso humano. El adyuvante clásico es el de Freund, que es una emulsión de agua en aceite. La forma completa consta de una emulsión de agua en aceite de parafina más micobacterias inactivadas; la incompleta carece de micobacterias. La persistencia permanente de aceite en los tejidos y la producción ocasional de abscesos estériles significa que este adyuvante (la forma incompleta; la forma completa es incluso menos adecuada) no se utiliza en vacunas de uso humano.

Los adyuvantes montanides son similares al de Freund incompleto, pero son biodegradables y se han usado en los ensayos de vacunas contra HIV, paludismo y cáncer. Ribi, una formulación usada con frecuencia en el campo experimental, es una emulsión de agua en aceite que incorpora lípido A monofosforilado (MPL) y dimicolato de trehalosa micobacteriano (TDM). El MLA es un derivado de uno de los estimulantes más poderosos de células presentadoras de antígeno, es decir, lípido A proveniente del lipopolisacárido (LPS) de bacterias gramnegativas. Sin embargo, el lípido A tiene muchos efectos colaterales aunque su derivado, el MLA, es mucho menos tóxico. MF59 (Chiron, ahora Novartis) es una emulsión de aceite en agua que ha sido segura en millones de dosis de la vacuna antigripal en Europa. Estimula en forma eficaz las respuestas de anticuerpos y de células T $CD4^+$, pero no de células T $CD8^+$ en primates humanos y no humanos. AS02 (GlaxoSmithKline) es una emulsión de aceite en agua a la que se agregan dos inmunoestimulantes, 3D-MPL y QS21. 3D-MPL es un derivado de MPl, y QS21 es una saponina, purificada en un comienzo a partir de la corteza del árbol *Quillaja saponaria*, que estimula la inmunidad tanto de anticuerpos como mediada por células. Por consiguiente, AS02 se considera un adyuvante potencialmente poderoso para las vacunas en las que puede ser importante la inmunidad mediada por anticuerpos y por células T, como en el HIV, o en la que es probable que la inmunidad mediada por células T sea fundamental, como en la tuberculosis.

Los antígenos corpusculares inducen respuestas inmunitarias mucho mejores que las proteínas solubles. Los ISCOMS o complejos inmunoestimulantes aprovechan esto por el atrapamiento de antígenos en estructuras similares a cajas con las saponinas. ISCOMALRIX (CSL) perfecciona este concepto básico. Los oligonucleótidos sintéticos (desoxirribonucleótidos) que contienen motivos CpG no metilados (CpG ODN) son inmunoestimulantes potentes que actúan a través de la interacción con TLR9. Diferentes familias de CpG ODN pueden estimular en forma preferencial células distintas –células B–, células NK, células dendríticas, células T –$CD8^+$– implicadas en las respuestas inmunitarias. Los liposomas, los virosomas y las partículas similares a virus tienen la capacidad de presentar los antígenos en una forma multimérica y puede estimular respuestas inmunitarias incrementadas.

Varios patógenos ingresan en el organismo por las mucosas, y la inducción de las respuestas inmunitarias en estas superficies puede ser crucial para proporcionar la mejor protección contra la enfermedad. Muchos de los adyuvantes descritos antes pueden ser utilizados como adyuvantes de las mucosas. Sin embargo, hay también varias moléculas que son particularmente eficaces como adyuvantes de las mucosas; las más destacadas son la toxina colérica y la enterotoxina termoestable de *E. coli.* Las formas modificadas de las toxinas y sus subunidades pueden estimular respuestas muy poderosas de las mucosas a través de mecanismos hasta ahora no bien comprendidos.

En el Cuadro 13.5 se resumen algunos de los adyuvantes en etapa de desarrollo para su uso en vacunas humanas.

Inmunidad adquirida en forma pasiva

- La protección temporaria contra la infección o la eliminación de toxinas pueden lograrse con preparados de anticuerpos administradas en forma pasiva. Los antisueros provenientes de animales hiperinmunizados y de seres humanos inmunes clásicamente se utilizan en la protección pasiva, si bien cada vez más se dispone de anticuerpos monoclonales humanos.
- Los anticuerpos maternos proporcionan protección crucial al recién nacido a medida que madura su sistema inmunitario.

Principios de vacunación

- Las vacunas son eficaces debido a la memoria inmunitaria humoral y celular. Es probable que los anticuerpos inducidos por la vacunación sean fundamentales en la protección contra la mayoría de las bacterias y muchos virus y parásitos.
- La inmunidad comunitaria es importante para reducir la incidencia de enfermedades cuando la transmisión se produce entre seres humanos.

Microorganismos muertos como vacunas

- Se han utilizado extensamente bacterias y virus muertos como vacunas eficaces.

Microorganismos vivos atenuados

- Sus ventajas son que cuanto mayor es la dosis de antígeno proporcionada por el microorganismo replicante, mejor es la tendencia de inducir inmunidad celular y de generar una respuesta inmunitaria en el sitio de infección natural.
- Los vectores no patógenos, como los adenovirus, el virus atenuado de la viruela aviar y el virus de la vacuna Ankara modificado pueden servir como "transportador" para genes provenientes de otros microorganismos patógenos que son difíciles de atenuar.
- La BCG es un buen vehículo para los antígenos que requieren inmunidad mediada por células T CD4. Los constructos de salmonela pueden proporcionar inmunidad oral y sistémica. La inmunización intranasal gana cada vez más popularidad.
- El riesgo con los microorganismos vivos atenuados es la reversión hacia formas virulentas y el peligro para los pacientes inmunocomprometidos.

Vacunas de subunidades

- Los microorganismos enteros tienen múltiples antígenos, algunos de los cuales no son protectores o pueden inducir hipersensibilidad o, incluso, ser inmunosupresores.
- En estos casos, lo más sensato es utilizar componentes purificados o los obtenidos mediante recombinación.
- Los toxoides (toxinas inactivadas) son eficaces como vacunas para prevenir enfermedades debidas a algunos agentes bacterianos.
- La partícula del antígeno de superficie de la hepatitis B es un ejemplo clásico de una vacuna viral de subunidad eficaz.
- Muchas vacunas antibacterianas exitosas se dirigen a los glucanos de la superficie del microorganismo mediante preparados glucoconjugados.
- El DNA que codifica las proteínas de un patógeno se puede inyectar directamente en el músculo para generar las proteínas a nivel local y producir respuestas inmunitarias. Las ventajas son la estabilidad, la facilidad de la producción y el bajo costo. El método no ha sido tan eficaz en los seres humanos como en los ratones, pero son promisorios los desarrollos más nuevos, como el cebado del DNA con una proteína o un vector.

Enfoques más nuevos para las vacunas

- Los adelantos proporcionados por la genómica han sido cruciales, ya que permitieron un enfoque racional para la identificación de muchos más sitios específicos para la acción de las vacunas bacterianas. La "vacunología inversa" se ha aplicado con éxito para el desarrollo de una vacuna MenB.
- Patógenos muy variables, como el HIV y el HVC, presentan problemas especiales para el diseño de vacunas que requieren la inducción de respuestas inmunitarias ampliamente protectoras. Aquí se están adoptando enfoques moleculares para describir cómo interactúan los anticuerpos neutralizantes con sus sitios de acción específicos y utilizan la información para diseñar en forma racional los candidatos de las vacunas.

Vacunas actuales

- Los niños en los Estados Unidos y Gran Bretaña son inmunizados de manera sistemática con toxoides diftérico y tetánico, y con pertussis acelular (vacuna triple DTP), con cepas atenuadas de los virus del sarampión, la parotiditis y la rubéola (MMR), virus inactivados de la poliomielitis y polisacárido capsular de *H. influenzae* tipo b (Hib) unido a un transportador.
- Aunque en el Reino Unido y muchos otros países la BCG se administra a los 10-14 años de edad o, en el caso de los lactantes de alto riesgo, inmediatamente después del nacimiento, en los Estados Unidos no se utiliza la vacunación sistemática.
- Las vacunas contra el carbunco, el virus de la encefalitis japonesa, la hepatitis A, la fiebre amarilla, el cólera y la rabia, entre otras, no se administran en forma habitual, pero están disponibles para los viajeros y los grupos de alto riesgo.

Vacunas en etapa experimental

- En el paludismo, se informó que una vacuna redujo en forma significativa la incidencia de la enfermedad palúdica grave en niños pequeños, y los esfuerzos intensos se centran en el seguimiento. Muchos investigadores argumentan que una vacuna eficaz debería estar dirigida contra varios antígenos y diferentes estadios del ciclo vital del parásito.
- Se informó el éxito probable de una vacuna contra el HIV, y los esfuerzos se centran en la comprensión de si existe una posible correlación con algún grado de protección.
- Se están realizando intentos para elaborar vacunas contra muchos patógenos, como *Clostridium difficile*, virus del dengue, virus del herpes simple y virus del Nilo occidental.

Adyuvantes

- Los adyuvantes generan respuestas inmunitarias de mayor duración. En general, no se necesitan para las vacunas con microorganismos atenuados, pero son fundamentales para las vacunas de subunidades proteicas.
- Los adyuvantes actúan mediante la inmunoestimulación, la provisión del antígeno o ambos mecanismos.

- La inmunoestimulación surge por la acción de moléculas como agonistas del TLR, citocinas y exotoxinas bacterianas, que implican sobre todo a la célula dendrítica. Los vehículos para la provisión del antígeno evitan la dispersión del antígeno y favorecen su lenta liberación. Incluyen las sales minerales y las emulsiones.
- Ciertos adyuvantes, como la toxina del cólera, son potentes en estimular las respuestas de las mucosas, que pueden ser más adecuados para ciertos patógenos que infectan a través de las superficies de las mucosas.

LECTURAS ADICIONALES

Allen A. (2008) Vaccine: the controversial story of medicine's greatest life saver. W.W. Norton & Company, New York.

Amanna I.J., Messaoudi I. & Slifka M.K. (2008) Protective immunity following vaccination: how is it defined? Human Vaccines 4, 316–319.

Amanna I.J. & Slifka M.K. (2009) Wanted, dead or alive: new viral vaccines. Antiviral Research 84, 119–130.

Astronomo R.D. & Burton D.R. (2010) Carbohydrate vaccines: developing sweet solutions to sticky situations? Nature Reviews Drug Discovery 9, 308–324.

Barrett A.D. & Beasley D.W. (2009) Development pathway for biodefense vaccines. Vaccine 27, D2–D7.

Birkett A.J. (2010) PATH Malaria Vaccine Initiative (MVI): perspectives on the status of malaria vaccine development. Human Vaccines 6, 139–145.

Casadevall A., Dadachova E. & Pirofski L.A. (2004) Passive antibody therapy for infectious diseases. Nature Reviews Microbiology 2, 695–703.

Frazer I.H., Lowy D.R. & Schiller J.T. (2007) Prevention of cancer through immunization: prospects and challenges for the 21st century. European Journal of Immunology 37 (Suppl 1), S148–S155.

Haque A. & Good M.F. (2009) Malaria vaccine research: lessons from 2008/9. Future Microbiology 4, 649–654.

Henderson D.A. (2009) Smallpox—the death of a disease: the inside story of eradicating a worldwide killer. Prometheus Books, New York.

Horimoto T. & Kawaoka Y. (2009) Designing vaccines for pandemic influenza. Current Topics in Microbiology and Immunology 333, 165–176.

Offit P.A. (2007) Vaccinated: one man's quest to defeat the world's deadliest diseases. Smithsonian Books, New York.

Oldstone M.B. (2009) Viruses, plagues, and history: past, present and future. 2nd edn. Oxford University Press, Oxford.

Plotkin S.A. (2010) Correlates of protection induced by vaccination. Clinical Vaccine and Immunology 17, 1055–1065.

Reed S.G., Bertholet S., Coler R.N. & Friede M. (2009) New horizons in adjuvants for vaccine development. Trends in Immunology 30, 23–32.

Rinaudo C.D., Telford J.L., Rappuoli R. & Seib K.L. (2009) Vaccinology in the genome era. Journal of Clinical Investigation 119, 2515–2525.

Sinden R.E. (2010) A biologist's perspective on malaria vaccine development. Human Vaccines 6, 3–11.

Taylor K., Nguyen A. & Stéphenne J. (2009) The need for new vaccines. Vaccine 27, G3–G8.

Virgin H.W. & Walker B.D. (2010) Immunology and the elusive AIDS vaccine. Nature 464, 224–231.

Welsh R.M., Che J.W., Brehm M.A. & Selin L.K. (2010) Heterologous immunity between viruses. Immunological Reviews 235, 244–266.



CAPÍTULO 14
Inmunodeficiencia

Conceptos clave

A modo de resumen...

Las células madre hematopoyéticas pluripotentes pueden desarrollarse en la médula ósea ya sea por la vía linfoide o mieloide para diferenciarse en los distintos tipos celulares que median la respuesta inmunitaria. La migración de las células del sistema inmunitario desde la circulación sanguínea hacia los tejidos se realiza mediante moléculas de adhesión celular, factores quimiotácticos y componentes del complemento que regulan la respuesta inflamatoria. Al ingresar en los tejidos, las células fagocíticas de la respuesta innata fagocitan y con posterioridad destruyen a los patógenos mediante una plétora de agentes microbicidas. Las células *natural killer* (NK) participan en las infecciones intracelulares, una situación en la que el patógeno está protegido de los efectos de los fagocitos y del complemento. La respuesta inmunitaria adquirida mediada por las células B productoras de anticuerpos junto con las células T *helper*, citotóxicas y reguladoras respaldan a estas respuestas innatas. Aunque normalmente todas las células y las moléculas del sistema inmunitario interactúan de manera eficaz para combatir las infecciones, siempre existe la posibilidad de que uno o más participantes puedan fallar, debido a defectos de genes heredados o a daños causados por factores externos.

Introducción

En consonancia con el aforismo de que "la mayoría de las cosas que pueden salir mal, salen mal", en los seres humanos se conocen numerosos estados de inmunodeficiencia que **no son secundarios** a factores medioambientales. Estos "experimentos de la naturaleza" proporcionan indicios valiosos respecto del papel de los factores deficientes involucrados. Con anterioridad hicimos hincapié en la manera por la cual la interacción del complemento, los anticuerpos y las células fagocíticas constituyen la base del

Roitt's Essential Immunology, Twelfth Edition. Peter J. Delves, Seamus J. Martin, Dennis R. Burton, Ivan M. Roitt.

Introducción *(continuación)*

mecanismo de defensa tripartito contra las infecciones piógenas (formadoras de pus) por bacterias que requieren la opsonización previa a la fagocitosis. No es sorprendente, entonces, que la deficiencia en cualquiera de estos factores pueda predisponer al individuo a infecciones repetidas de este tipo. Los pacientes con deficiencia de células T presentan, de hecho, un patrón marcadamente diferente de infección y son susceptibles a bacterias intracelulares, virus y hongos que suelen ser erradicados por la inmunidad mediada por células (IMC).

En las secciones siguientes se examinarán en primer lugar algunos ejemplos de estas **inmunodeficiencias primarias**, relativamente infrecuentes, que tienen una base genética. Después analizaremos los diversos factores medioambientales, como las infecciones y la desnutrición, que pueden ser los determinantes de las **inmunodeficiencias secundarias**, mucho más frecuentes.



Deficiencias de los mecanismos inmunitarios innatos

Defectos en la señalización del receptor de reconocimiento de patrón

El reconocimiento de los patrones moleculares asociados con el patógeno es fundamental para la detección de microorganismos por las células de la respuesta innata. Se han descrito varios defectos génicos que producen alteraciones de la señalización a través de los receptores de reconocimiento. La proteína adaptadora MyD88 es necesaria para la señalización a través de varios receptores de tipo Toll (TLR); los pacientes con deficiencia de MyD88 sufren de infecciones graves potencialmente mortales con bacterias piógenas, como neumococos y *Salmonella.* La cinasa 4 asociada a IL1R (IRAK4) participa en la señalización a través de los receptores para IL-1 e IL-18 y también a través del heterodímero TLR1/2, el heterodímero TLR2/6, TLR7 y TLR8. En los individuos deficientes de IRAK4, las bacterias piógenas grampositivas, como *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus,* son las que se observan con mayor frecuencia. En respuesta a la ocupación por sus ligandos, los TLR (TLR3, TLR-7, TLR-8 y TLR-9) interactúan con la molécula accesoria UNC93B, residente en el retículo endoplasmático. Las deficiencias en esta proteína se asocian particularmente con la encefalitis por el virus herpes simple.

Defectos de la célula fagocítica (Cuadro 14.1)

En la **enfermedad granulomatosa crónica,** los monocitos, los macrófagos y los neutrófilos no producen especies reactivas del oxígeno debido a un defecto en el sistema de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa activado de modo habitual por la fagocitosis. El componente citocromo b_{558} de este sistema está formado por subunidades *phox (phagocyte oxidase,* fagocito oxidasa) de 91 y 22 kDa, y en la forma ligada al cromosoma X de la enfermedad hay

Cuadro 14.1. Deficiencias de las células fagocíticas.

Gen defectuoso	Trastorno	Infecciones típicas
CD18 subunidad β	Deficiencia de la adhesión de leucocitos	Bacterias piógenas
IFNγRI, IFNγR2, IL-12 p40, subunidad β1 compartida de IL-12R/1L-23R o STAT1	Susceptibilidad mendeliana a la enfermedad micobacteriana	Micobacterias, *Salmonella,* virus
IRAK4	Deficiencia de IRAK4	*Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes,* neumococos, especies de *Aspergillus.*, *Pseudomonas aeruginosa*
LYST	Chediak-Higashi	Ninguna
MEVF	Fiebre familiar del Mediterráneo	*Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus,*
MyD88	Deficiencia de MyD88	*Pseudomonas aeruginosa*
p22phox, p40phox, p47phox, p67phox o gp9lphox	Enfermedad granulomatosa crónica	*Staphylococcus aureus, Aspergillus fumigatus, Candida albicans*
TNFRSFIA	Síndrome periódico asociado con el receptor para TNF	Ninguna
UNC93B	Deficiencia de UNC93B	Virus herpes simple

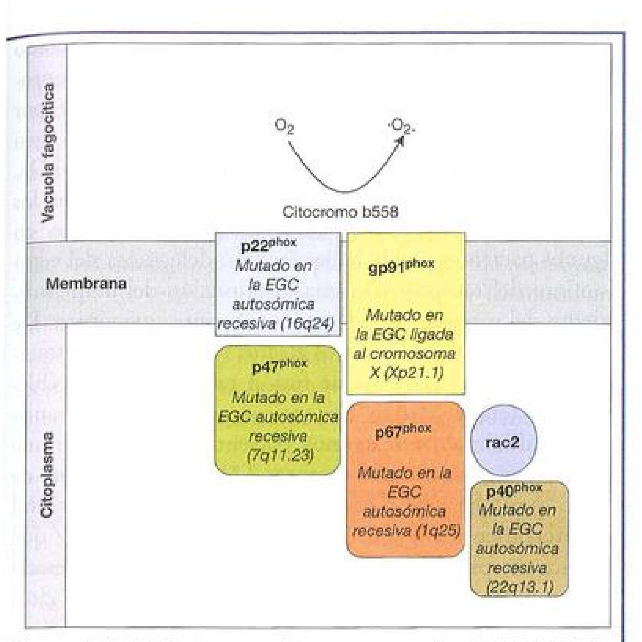


Figura 14.1. Mutaciones en los componentes de la NADPH oxidasa que determinan la enfermedad granulomatosa crónica (EGC).

El citocromo b_{558} de la membrana del fagocito está compuesto por p22^{phox} y p91^{phox}. Tras la activación celular, las proteínas citosólicas p47^{phox}, p67^{phox} y p40^{phox}, junto con la pequeña proteína de unión al GTP rac2, se asocian con el citocromo b_{558} para formar el complejo NADPH oxidasa activo, que causa la generación del anión superóxido (véase la Figura 1.18). La mayor parte de los pacientes con esta EGC tiene la forma ligada al cromosoma X de la enfermedad, que implica mutaciones del gen *gp91^{phox}*. Las mutaciones en los genes que codifican otros componentes de la NADPH oxidasa causan las formas autosómicas de la enfermedad.

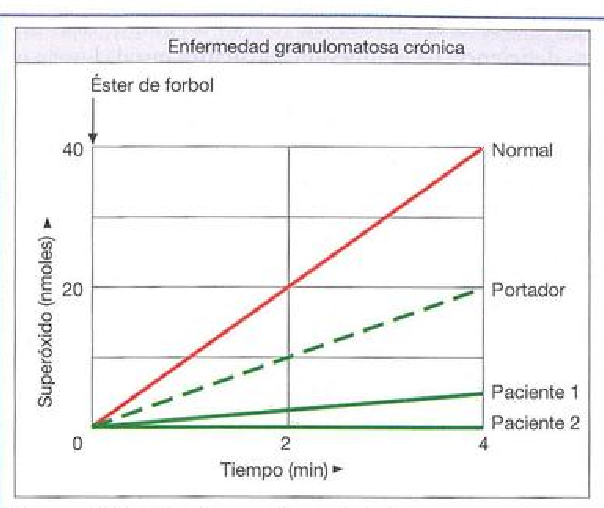


Figura 14.2. Estallido respiratorio defectuoso en los neutrófilos de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica.

La activación de NADP/citocromo oxidasa es determinada por la producción del anión superóxido ($\cdot O_2^-$; véase la Figura 1.9) después de la estimulación con acetato de forbol miristato. El paciente 2 tiene una mutación *p91^{phox}* que impide la expresión de la proteína, mientras que el paciente 1 presenta la mutación *p91^{phox}* variante que produce niveles muy bajos pero mensurables. Muchos portadores de la enfermedad ligada al cromosoma X expresan niveles intermedios, como en el caso ilustrado, que corresponde a la madre del paciente 2. (Datos de Smith R.M. y Curnutte J.T. [1991] *Blood* **77**, 673.)

mutaciones en el gen que codifica la mayor de esas subunidades (Figura 14.1). En la mayoría de casos, no se produce el citocromo, pero una mutación gp91 variable permite la síntesis de bajos niveles de la proteína (Figura 14.2), situación que puede mejorarse por el tratamiento con interferón γ. No sorprende que la desactivación génica de gp91^{phox} provea un modelo murino conveniente. El 30% de los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica que heredan el trastorno como rasgo autosómico recesivo expresan una forma defectuosa de la oxidasa que es el resultado de las mutaciones en la subunidad más pequeña p22^{phox} del citocromo y en las moléculas citosólicas p47^{phox} y p67^{phox} (Figura 14.1).

Es curioso que el espectro de patógenos infecciosos que aquejan a estos pacientes sea relativamente restringido. El agente más común es *Staphylococcus aureus*, pero ciertos bacilos gramnegativos y también hongos como *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* están con frecuencia involucrados (Figura 14.3). Los factores subyacentes de esta restricción son dobles. En primer lugar, muchas bacterias ayudan a provocar su propia autodestrucción por medio de la generación de H_2O_2 a través de su propio proceso metabólico, pero si son catalasa positivos, el peróxido es destruido y las bacterias pueden sobrevivir. Así, los neutrófilos de estos pacientes captan con facilidad los estafilococos catalasa positivos en presencia de anticuerpo y complemento, pero fallan en la producción de su muerte de modo intracelular. En segundo lugar, los microorganismos más virulentos tienden a ser aquellos que son muy resistentes a los mecanismos microbicidas independientes del oxígeno del fagocito.

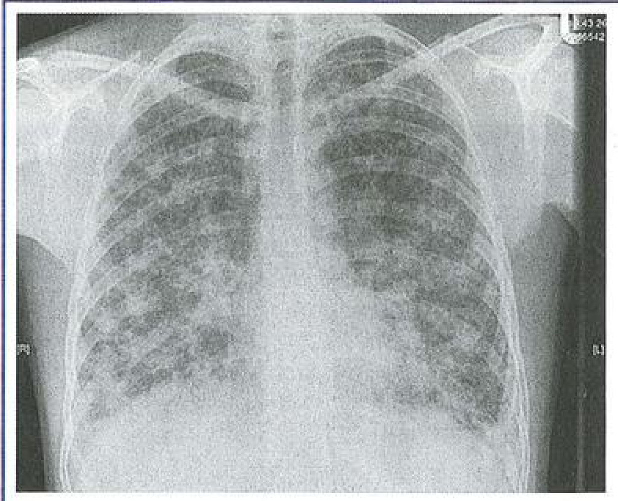


Figura 14.3. Neumonitis fulminante en un paciente con enfermedad granulomatosa crónica (EGC).

Radiografía de tórax en un joven de 15 años con EGC autosómica recesiva en la que se observan infiltrados densos bilaterales debidos a neumonitis por *Aspergillus fumigatus y Absidia corymbifera*. (De Slatter M.A. y Gennery A.R. [2008] *Clinical Experimental Immunology* **152**, 389-396. Gentileza de la Paediatric Immunology Unit, Newcastle General Hospital, UK.)

La falta de la subunidad CD18 β de las β2 integrinas causa una **deficiencia de la adhesión leucocítica** que da lugar a una alteración de la quimiotaxis del neutrófilo y a infección bacteriana recurrente. La migración de monocitos, eosinófilos y linfocitos no está afectada ya que pueden recurrir al sistema de la β_1 integrina alternativo VCAM-1/VLA-4. En la **enfermedad de Chediak-Higashi** y el equivalente murino "beige", la disfunción de las células NK, las células T citotóxicas y los neutrófilos se asocia con defecto en el gen *LYST* (*lysosomal trafficking*). La acumulación de gránulos intracitoplasmáticos gigantes se debe a la migración defectuosa del compartimiento tardío endosómico/lisosómico dentro de la célula. Los pacientes sufren en oportunidades infecciones piógenas mortales, en particular por *Staphylococcus aureus*. La mayoría de los pacientes desarrolla una "fase acelerada" de la enfermedad en la que hay proliferación incesante de células T, pero esto puede controlarse con el trasplante de médula ósea.

La **susceptibilidad mendeliana a la enfermedad micobacteriana** en los seres humanos, que involucra la BCG o las micobacterias no tuberculosas, puede remontarse a mutaciones recesivas en cinco genes, dos que afectan las cadenas del receptor IFNγ (IFNγR1 e IFNγR2), y los otros, la subunidad IL-12 p40, la subunidad β1 compartida por IL-12R/IL-23R y el transductor de la señal y la molécula activadora de la transcripción (STAT1). Esta última participa en la señalización a través de varios receptores para citocina que incluyen los receptores para interferón. Además de ser particularmente propensos a las infecciones micobacterianas, los pacientes con esta susceptibilidad también presentan mayor propensión a otras infecciones por bacterias intracelulares, sobre todo *Salmonella*, y a virus. Dado que IL-12 dirige la diferenciación de la subpoblación Th1 productora de IFNγ, en conjunto los genes implicados en la susceptibilidad mendeliana a la enfermedad micobacteriana subrayan la función del IFNγ en mediar la protección contra la infección intracelular.

Existe un grupo denominado **trastornos "autoinflamatorios"** que se caracteriza por una inflamación al parecer no provocada. Uno de éstos, el **síndrome periódico asociado con el receptor TNF**, se presenta con ataques de fiebre prolongada e inflamación localizada intensa causados por mutaciones heredadas de modo dominante en el gen *TNFRSFIA* que codifica el receptor TNF de 55kDa. Aunque todavía no están completamente dilucidados los mecanismos que producen la inflamación persistente, en algunos pacientes puede haber escisión defectuosa del ectodominio del receptor con una disminución del desprendimiento del receptor soluble potencialmente antagónico. De hecho, es saludable señalar los efectos beneficiosos del tratamiento con una proteína de fusión recombinante TNFR-Fcγ p75 (etanercept) o un anticuerpo monoclonal anti-TNF (infliximab) en algunos pacientes con el síndrome periódico asociado con el receptor TNF. Otro síndrome de fiebre periódica hereditaria es la **fiebre familiar del Mediterráneo**, debida a mutaciones en el gen *MEFV* que codifica la pirina, un regulador inflamatorio expresado sobre todo en neutrófilos y monocitos activados por la citocina Th1.

Deficiencias del sistema del complemento (Cuadro 14-2)

Defectos en las proteínas de control

La importancia del complemento en la defensa contra la infección es destacada por la aparición de infecciones reiteradas potencialmente mortales producidas por bacterias piógenas en pacientes que carecen del factor 1, el inactivador del C3b. Debido a la incapacidad de destruir el C3b, se observa una activación incesante de la vía alternativa a través del ciclo de retroalimentación, lo cual conduce a concentraciones muy bajas de C3 y factor B, con niveles normales de C1, C4 y C2.

Los eritrocitos son bombardeados diariamente con C3b generado a través de la formación de C3 convertasa de fase líquida de la vía alternativa a partir de la hidrólisis espontánea del tioléster interno del C3. Para combatir esto, el eri-

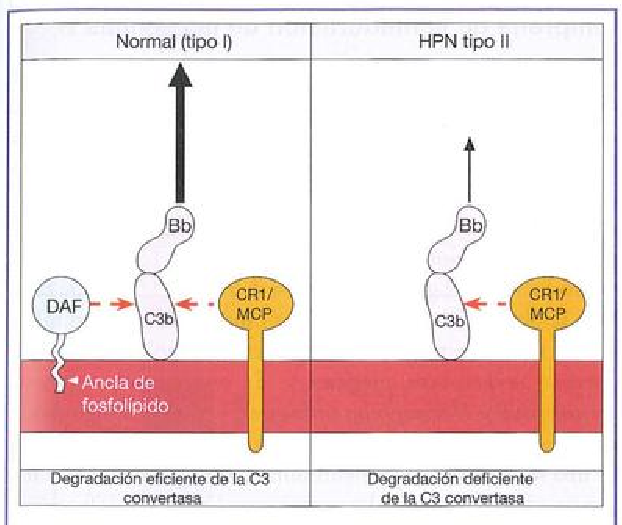
Cuadro 14.2. Deficiencias de las vías del complemento.

Gen defectuoso	Trastorno	Infecciones típicas
Clq, C1r, Cls o C4	Predisposición al lupus eritematoso sistémico	Usualmente ninguna
Inhibidor de C1	Angioedema hereditario	Usualmente ninguna
C2	Predisposición al lupus eritematoso sistémico	Bacterias piógenas, sobre todo neumococos
C5, C6 o C8	Predisposición al lupus eritematoso sistémico	*Neisseria gonorrhoeae, N. meningitidis*
C3 o Factor H	Degeneración macular relacionado con la edad	Bacterias piógenas
C7, C9, Factor D o properdina	–	*N. gonorrhoeae, N. meningitidis*
Factor 1	–	Bacterias piógenas
MASP-2	–	*Streptococcus pneumoniae*
MBL	–	Ninguna
PIG-A	Hemoglobinuria paroxística nocturna	Usualmente ninguna

trocito cuenta con varios componentes reguladores en su superficie. El complejo C3 convertasa se disocia por el factor de aceleración de degradación (DAF; CD55) y por los receptores CR1 del complemento (sin olvidarse del factor H de la fase líquida), después de lo cual el C3b es desmembrado por el factor 1 junto con el CR1, proteína del cofactor de membrana (MCP) o factor H (Figura 14.4). Hay también dos inhibidores del complejo de ataque de membrana, el factor de restricción homólogo (HRF) y la abundante molécula protectina (CD59) que, por unión con el C8, impide el desplegado de la primera molécula de C9 necesaria para la inserción en la membrana. DAF, HRF y CD59 se unen a la membrana a través de anclajes de glucosil fosfatidilinositol. En una enfermedad conocida como **hemoglobinuria paroxística nocturna**, se produce un defecto en la capacidad de sintetizar estos anclajes, causado por una mutación en el gen *PIG-A* ligado al cromosoma X que codifica la enzima requerida para agregar la *N*-acetil glucosamina al fosfatidilinositol. En ausencia de estos reguladores del complemento, tiene lugar la lisis de los eritrocitos. El fenotipo en el cual hay niveles normales de estas moléculas protectoras se denomina como "tipo I". En el tipo II hay un defecto en DAF, pero en la forma del tipo III, más grave, también son afectadas la protectina y el HRF, y la susceptibilidad a la lisis espontánea mediada por complemento está muy aumentada (Figura 14.4). Un anticuerpo monoclonal contra el componente C5 del complemento, el eculizumab, es eficaz para el tratamiento de la hemoglobinuria paroxística nocturna porque impide la escisión mediada por la C5 convertasa y, por lo tanto, la generación del complejo de ataque de membrana.

El polimorfismo del factor H, específicamente la presencia de una histidina en lugar de una tirosina en la proteína C reactiva, y la región de unión a la heparina en el residuo 402 predisponen al desarrollo de la **degeneración macular relacionada con la edad**, como lo hace la presencia de glicina en lugar de una arginina en la posición 102 en el componente C3 del complemento. No está claro hasta ahora por qué estos polimorfismos son factores de riesgo.

Un gen defectuoso para el inhibidor del C1 se asocia con el **angioedema hereditario** y esto puede conducir a los episodios recurrentes de edema no inflamatorio circunscrito agudo mediado por un fragmento C2 vasoactivo (Figura 14.5). Los pacientes son heterocigotos (no se describieron nunca homocigotos) y sintetizan cantidades pequeñas del inhibidor, que pueden elevarse a niveles útiles con la administración del esteroide anabólico sintético danazol o, en casos



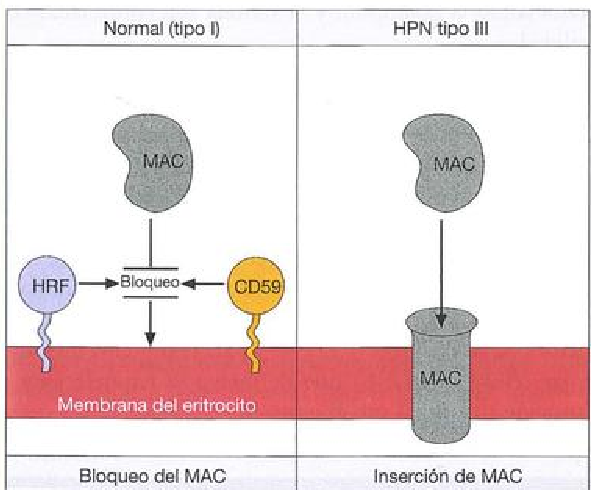


Figura 14.4. Hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN).

Una mutación en el gen *PIG-A*, que codifica la enzima α-1,6-*N*-acetil glucosaminil transferasa, da lugar a la incapacidad de sintetizar las anclas de glucosil fosfatidilinositol, priva a la membrana del eritrocito de las proteínas del control del complemento y convierte a la célula en susceptible a la lisis mediada por el complemento. El tipo II se asocia con un defecto del DAF y el tipo III más grave, con una deficiencia adicional de CD59 (protectina) y HRF. DAF, factor de aceleración de la degradación; CR1, receptor del complemento tipo 1; MCP, proteína del cofactor de membrana; HRF, factor de restricción homólogo; MAC, complejo de ataque de membrana.

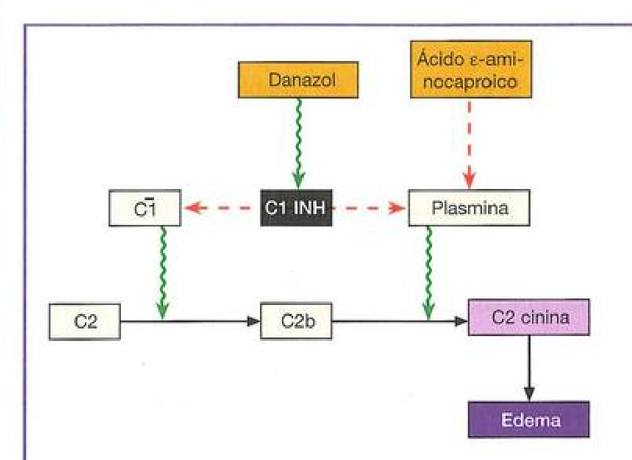


Figura 14.5. Deficiencia del inhibidor de C1 y angioedema.

El inhibidor de C1 inhibe de modo estequiométrico a la fracción C1, la plasmina, la calicreína y el factor de Hageman activado, y la deficiencia conduce a la formación de cinina C2 vasoactiva por el mecanismo ilustrado. La síntesis del inhibidor de C1 puede ser estimulada por metiltestosterona o, de preferencia, por el esteroide sintético masculinizante danazol; de manera alternativa, los ataques pueden ser controlados con la administración de ácido ε-aminocaproico para inhibir la plasmina.

críticos, del propio inhibidor purificado. El ácido ε-aminocaproico, que bloquea la liberación de la cinina C2 inducida por plasmina, constituye un tratamiento alternativo.

Deficiencia de componentes de la vía del complemento

Las deficiencias en C1q, C1r, C1s, C2, C4, C5, C6 y C8 predisponen al desarrollo de enfermedades por inmunocomplejos como lupus eritematoso sistémico (LES), quizá por disminución en la capacidad de responder adecuadamente a las infecciones por agentes etiológicos potenciales o, en el caso de los componentes más tempranos, con más probabilidad de eliminar en forma eficaz los complejos antígeno-anticuerpo. Si se tiene presente el centro de la respuesta autoinmunitaria en el LES en los constituyentes moleculares de las burbujas que aparecen en la superficie de las células apoptósicas, la importancia del C1q en la unión a estos cuerpos apoptósicos y a su depuración se torna máxima. Por ello, los ratones con deficiencia de C1 desarrollan títulos elevados de anticuerpos antinucleares y mueren por una glomerulonefritis grave.

Los pacientes que presentan deficiencias de C7 o de C9 muestran mayor susceptibilidad a las infecciones diseminadas por *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis.* Estas infecciones también son características de las deficiencias en los componentes de la vía alternativa, el factor D y la properdina. Es interesante que la incapacidad de producir un complejo de ataque a la membrana que implica los componentes C5b–9 del complemento no tiene un efecto sustancial en la incidencia de otros tipos de infección. La protección adecuada podría depender en gran medida de la opsonización de los microorganismos con anticuerpos con los componentes C3b, C4b e iC3b del complemento o sin ellos para la fagocitosis ulterior, y el mecanismo de adherencia inmunitaria por medio del cual los microorganismos recubiertos con estos componentes tempranos del complemento se unen al receptor CR1 del complemento de los eritrocitos y son transportados hacia el hígado o el bazo para su destrucción. La deficiencia de C3, si bien muy rara, afectará las tres vías de activación del complemento y se asocia con infecciones piógenas recidivantes.

Las mutaciones que conducen a niveles reducidos de la lectina de unión a la manosa (MBL, *mannose-binding lectin*) son bastante comunes, pero esto no conduce a un aumento detectable en la mayoría de los casos. Es probable que la activación del complemento por otras lectinas de mamíferos, como la ficolina, o en realidad por la vía mediada por anticuerpos, compense la ausencia de la vía mediada por MBL. Sin embargo, otros individuos con deficiencia de serina proteasa-2 asociada con MBL (MASP-2; *MBL-associated serine protease-2*), debida a una mutación que torna a la enzima no funcional, aumentan las infecciones por microorganismos como *Streptococcus pneumoniae.*

Deficiencia primaria de células B (Cuadro 14.3)

Agammaglobulinemia debida a una falla temprana de la maduración de las células B

La **agammaglobulinemia ligada al cromosoma X** es uno de los diversos síndromes de inmunodeficiencia que ha sido mapeado en el cromosoma X (Figura 14.6). El defecto tiene lugar en el estadio de célula pre-B, y la producción de inmunoglobulina en los varones afectados está notablemente deprimida, por lo cual se observan escasos folículos linfoides o plasmocitos en las biopsias de ganglios linfáticos. Las mutaciones se producen en el gen tirosincinasa de Bruton (*Btk*), que también se observa en ratones *xid.* Los niños experimentan infecciones repetidas por bacterias piógenas como *Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes* y *S. pneumoniae, Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae,* y por un hongo (antes clasificado como protozoo), *Pneumocystis jirovecii,* que produce una forma extraña de neumonía. Las respuestas inmunitarias mediadas por células son normales, y las infecciones virales como el sarampión y la varicela son controladas con facilidad.

Las mutaciones, tanto en la cadena pesada μ como en la cadena λ_5, que contribuyen a la sustitución del receptor IgM en las células pre-B, dan como resultado un fenotipo similar al observado en la agammaglobulinemia congénita de Bruton con detención en el estadio pro-B. La inferencia sería que *Btk* proporcionaría la señal para la diferenciación de pro-B a pre-B a través de este complejo receptor de célula pre-B. Otras mutaciones que causan fenotipos similares son las que se producen en los genes para la proteína transductora de la señal Igα (CD79a) y para la proteína de unión de las células *B* BLNK, que de nuevo se requiere para la transición de células pro-B a pre-B.

Cuadro 14.3. Deficiencias que afectan a los linfocitos B.

Gen defectuoso	Trastorno	Infecciones típicas
BAFFR, CD19, ICOS o TACI	Inmunodeficiencia común variable	*S. pneumoniae, H. influenzae,* especies de *Mycoplasma*
Btk	Agammaglobulinemia ligada al X	*S. aureus, S. pyogenes, S. pneumoniae, N. meningitidis, H. influenzae, Pneumocystis jirovecii*
Ig Cμ, λ5, Igα o BLNK	–	*S. aureus, S. pyogenes, S. pneumoniae, N. meningitidis, H. influenzae, Pneumocystis jirovecii*
Desconocido	Deficiencia selectiva de IgA	La mayoría asintomáticas; algunas veces, infecciones broncopulmonares

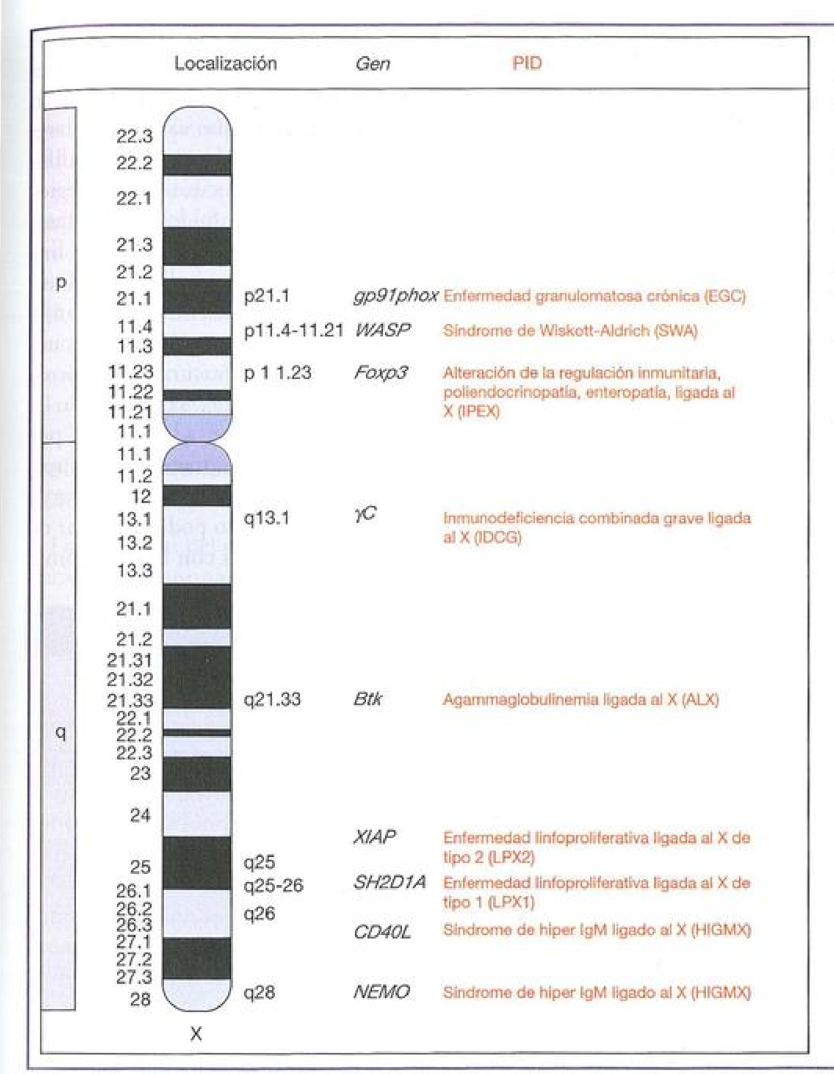


Figura 14.6. Loci de los principales síndromes de inmunodeficiencia ligados al cromosoma X.

Los varones serán afectados con más probabilidad por los genes recesivos ligados al cromosoma X porque, a diferencia de las mujeres, en las que hay dos cromosomas X, no es necesaria la homocigosidad. En algunos casos, aún falta determinar la localización precisa de genes importantes. También se describieron otras inmunodeficiencias raras ligadas al X. Algunas de las enfermedades por inmunodeficiencia primaria mencionadas (p. ej., EGC, IDCG, HIGM) también pueden deberse a genes defectuosos de otros cromosomas.

Deficiencias que afectan a isotipos particulares de anticuerpos

La más común de todas las inmunodeficiencias primarias es la **deficiencia selectiva de IgA**, que afecta tanto la IgA circulante como la forma dimérica secretora y puede también ampliarse para incluir el isotipo IgG2. En algunos pacientes, hay ausencia completa de IgA mientras que otros tienen concentraciones bajas de estos anticuerpos. Casi todos los pacientes con deficiencia selectiva de IgA son asintomáticos. La **inmunodeficiencia común variable** (IDCV), en la que hay disminución de IgG, IgA, IgM o cualquier combinación de ellas, a menudo se produce dentro de la misma familia que la de pacientes con deficiencia selectiva de IgA, y sus miembros pueden gradualmente cambiar de una enfermedad a la otra. Los defectos génicos para estas inmunodeficiencias primarias en la mayoría de los pacientes aún no están totalmente definidos, si bien un pequeño número de pacientes con IDCV poseen mutaciones en el receptor BAFF de la superficie de la célula B, las moléculas TAC1 o CD19, o en la molécula ICOS de la superficie de la célula T. Todas estas moléculas participan en la activación del linfocito; quizá es una forma de explicar el aumento de la incidencia de enfermedades autoinmunitarias observada en pacientes con IDCV, una asociación que también se observa en individuos con deficiencia selectiva de IgA. Los pacientes con estas deficiencias de anticuerpos pueden ser protegidos contra infecciones piógenas recurrentes mediante la administración intravenosa o subcutánea de inmunoglobulina humana.

La hipogammaglobulinemia transitoria se observa en la vida temprana

Cierto grado de deficiencia de inmunoglobulina se comprueba de manera natural en lactantes a medida que disminuye el nivel de IgG de la madre, y puede convertirse en un problema grave en los recién nacidos muy prematuros. Una **hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia** más prolongada se caracteriza por infecciones respiratorias recurrentes y se asocia con concentraciones bajas de IgG que a menudo retornan casi abruptamente a los valores normales alrededor de los 4 años de edad. Hay una deficiencia en el número de linfocitos circulantes y en su capacidad de generar colaboración para la producción de inmunoglobulina por las células B activadas por el mitógeno fitolaca, pero esto se normaliza cuando la enfermedad se resuelve de modo espontáneo.

Deficiencia primaria de células T (Cuadro 14.4)

Los pacientes sin células T o con una función deficiente de las células T son vulnerables a las infecciones oportunistas, y como las células B dependen en gran medida de las células T, las deficiencias de las células T también repercuten de modo negativo en la inmunidad humoral. Las células T disfuncionales a menudo permiten la aparición de alergias, procesos malignos linfoides y síndromes autoinmunitarios, estos últimos probablemente originados a partir de la selección negativa ineficiente en el timo o la falla para generar células reguladoras apropiadas.

Desarrollo defectuoso del timo

El **síndrome de DiGeorge**, en el que hay mutaciones del factor de transcripción TBXI, que participa en el desarrollo embrionario, está caracterizado por una falla en el desarrollo adecuado del timo a partir de la tercera y la cuarta bolsas faríngeas (los niños con síndrome de DiGeorge también carecen de paratiroides y tienen anomalías cardiovasculares graves). Por consiguiente, las células madre no pueden diferenciarse para su transformación en linfocitos T, y las regiones "timodependientes" en el tejido linfoide están escasamente pobladas; por el contrario, se observan folículos linfoides aunque incluso éstos están mal desarrollados. Las respuestas de inmunidad mediada por células no se detectan, y si bien los lactantes pueden hacer frente a las infecciones bacterianas comunes, sucumben por las vacunas con microorganismos vivos atenuados como la del sarampión o el bacilo de Calmette-Guérin (BCG) si se administran por error. Pueden formarse anticuerpos humorales, pero la respuesta es subnormal, lo cual refleja la necesidad de la participación cooperativa de las células T. (No podemos dejar de mencionar la similitud de esta situación con la timectomía

Cuadro 14.4. Deficiencias que afectan a los linfocitos T.

Gen defectuoso	Trastorno	Infecciones típicas
AIRE	Síndrome poliendocrino autoinmunitario 1	*Candida albicans*
ATM	Ataxia telangiectasia	Broncopulmonares
CITTA	Deficiencia de clase II del CMH	Broncopulmonares
CD3γ	Deficiencia de CD3γ	Bacterias y virus
CD40L, CD40, AID, NEMO o UNG	Síndrome de hiper-IgM	*Pneumocystis jirovecii, Toxoplasma, Cryptosporidium parvum*
FAS o FASL	Síndrome proliferativo autoinmunitario	Ninguno
Foxp3	Desregulación inmunitaria, poliendocrinopatía, enteropatía ligada al X (IPEX)	Ninguno
γC, RAG-1, RAG-2, Artemis, ADA o IL-7R cadena α	Síndrome de Omenn	Varias (virales, bacterianas, micóticas), que incluyen *Pneumocystis jirovecii* y sepsis por *S. aureus*
NBS1	Síndrome de Nijmegen	Broncopulmonares
PNP	Deficiencia de PNP	Varias (virales, bacterianas, micóticas)
SH2DIA	Enfermedad linfoproliferativa ligada al X de tipo 1	Virus de Epstein-Barr
STAT3	Síndrome de hiper-IgE	Bacterias extracelulares, estafilococos, especies de *Aspergillus*, *C. albicans*
TAP-1, TAP-2 o tapasina	Deficiencia de moléculas de clase I del CMH	Broncopulmonares
TBX1	Síndrome de DiGeorge	Varias
WASP	Síndrome de Wiskott-Aldrich	Bacterias extracelulares encapsuladas
XIAP	Enfermedad linfoproliferativa ligada al X de tipo 2	Virus de Epstein-Barr
ZAP70	Deficiencia de ZAP70	Varias (virales, bacterianas, micóticas)

neonatal y la deficiencia de células B con la bursectomía neonatal en los pollos). El tratamiento mediante el injerto de timo neonatal conduce a la restauración de la inmunocompetencia, pero para el funcionamiento adecuado de los linfocitos T es esencial cierto grado de compatibilidad entre el CMH sobre las células tímicas no linfocíticas y las células periféricas. La ausencia completa del timo es bastante rara y con más frecuencia nos enfrentamos a un síndrome de DiGeorge parcial, en el que las células T pueden elevarse del 6% en el momento del nacimiento a cerca del 30% de linfocitos circulantes totales hacia el fin del primer año de vida (comparado con el valor normal del 60-70% al año de edad); las respuestas de anticuerpos son adecuadas.

Detención de la diferenciación temprana de las células T

La mutación del gen que codifica la enzima para la degradación de la purina, es decir, la **purina nucleósido fosforilasa**, lleva a la acumulación del metabolito desoxi-GTP, que es tóxico para los precursores de células T por su capacidad de inhibir la ribonucleótido reductasa, enzima requerida para la síntesis del DNA. El hecho de que la diana para esta deficiencia sea el linaje de células T podría estar relacionado con el nivel relativamente bajo de 5'-nucleotidasa. Algunas células T "se fugan" y confieren una protección inadecuada contra la infección y la enfermedad suele ser mortal a menos que se realice un trasplante de células madre de médula ósea. Además de las infecciones recurrentes, los pacientes suelen sufrir disfunción neurológica y autoinmunidad.

Muy pocos genes diferentes, como los de RAG-1, RAG-2, Artemis, cadena α del receptor para IL-7, adenosina desaminasa y la cadena γC compartida del receptor de interleucina, se han relacionado con el **síndrome de Omenn**. Como veremos enseguida, las mutaciones de estos genes también son responsables de la inmunodeficiencia combinada grave (IDCG), pero en el síndrome de Omenn las mutaciones particulares implicadas son "fáciles de quebrantar" y da como resultado un fenotipo menos devastador. Por ejemplo, las mutaciones en RAG permiten que algunas células T salgan de modo furtivo debido a que la recombinación *VDJ* no está abolida por completo. A menudo, los pacientes presentan eosinofilia y elevaciones de la IgE y, en oportunidades, sufren enfermedades autoinmunitarias que afectan la piel y el intestino.

La **deficiencia de las moléculas de clase II del CMH** (a veces denominado como "síndrome del linfocito desnudo") se asocia con infecciones broncopulmonares recurrentes y diarrea crónica dentro del primer año de vida, y la muerte es provocada por infecciones virales incontrolables a una edad promedio de 4 años, a menos que los lactantes afectados sean tratados de manera exitosa con trasplante de células madre hematopoyéticas. El cuadro se origina por mutaciones que afectan cualquiera de los varios factores de transcripción que controlan la expresión de los genes de clase II, por ejemplo el *transactivador de clase II* (CITTA). La expresión débil de las moléculas de clase II en las células del epitelio tímico impide en gran medida la selección positiva de células T *helper* CD4, y aquellas que escapan no serán estimuladas por la falta de moléculas de clase II en las células presentadoras de antígenos. Es de observar que los pacientes ocasionales con mutaciones en los genes *TAP-1, TAP-2* o *tapasina* tienen deficiencia de moléculas de clase I del CMH.

Deficiencias que dan lugar a colaboración disfuncional de células T-B

La inmunidad mediada por células (IMC) está deprimida en los pacientes inmunodeficientes con trombocitopenia y eccema (**síndrome de Wiskott-Aldrich**) o con **ataxia telangiectasia**. La proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich (**WASP**) desempeña una función crítica en relación con las vías de transducción de la señal y el citoesqueleto basado en actina por la agrupación física con la actina a través de la GTPasa Cdc42 y el complejo Arp2/3 (proteína relacionada con actina) que regulan la polimerización de la actina. Así, las mutaciones en el gen *WASP* afectan de modo adverso la movilidad celular, la quimiotaxis de los fagocitos, la circulación de las células dendríticas y la polarización del citoesqueleto de las células T hacia las células B durante la colaboración T-B. No sorprende que los niños afectados experimenten deficiencias de la inmunidad mediada por células y compromiso de la producción de anticuerpos. La **ataxia telangiectasia**, un **síndrome de ruptura cromosómica**, es un trastorno autosómico recesivo de la niñez caracterizado por ataxia cerebelosa progresiva con degeneración de las células de Purkinje, hipersensibilidad a los rayos X y una incidencia de cáncer anormalmente alta. El gen *a*taxia *t*elangiectasia *m*utado (*ATM*) codifica la proteincinasa Atm, un miembro de la familia fosfatidilinositol 3 cinasa implicado en la regulación del ciclo celular y la reparación de las rupturas de la doble cadena del DNA. Además, la Atm cinasa es necesaria para la autorrenovación de la célula madre hematopoyética mediante la inhibición del estrés oxidativo en estas células. Otra enfermedad caracterizada por disfunción inmunitaria, sensibilidad a la radiación y aumento de la incidencia de cáncer es el **síndrome de ruptura de Nijmegen**, en el que una mutación en el gen *NBS1 que codifica la* nibrina, un componente del complejo de reparación de las rupturas del DNA de doble cadena, se convierte en fosforilada por la Atm. Tanto la Atm como la nibrina son necesarias para la recombinación de cambio de clase eficaz en las células B.

Es interesante examinar la base molecular de las enfermedades que están siendo aclaradas, y un ejemplo excelente de la naturaleza que permite ver sus secretos fue proporcionado por los estudios del **síndrome de hiper-IgM**, un trastorno raro caracterizado por infecciones bacterianas recurrentes, concentraciones séricas muy bajas o ausentes de IgG, IgA e IgE, y normales a elevadas de IgM e IgD. Casi todos los pacientes presentan una forma de la enfermedad ligada al cromosoma X que implica mutaciones y deleciones puntuales en la célula T CD40L (CD154). Estas mutaciones son mapeadas en gran medida en la parte de la molécula que interviene en la interacción con la célula B CD40, que por eso mantiene a las células T incapaces de transmitir las señales necesarias para el cambio de la clase de inmunoglobulina en las células B. Con menos frecuencia, la mutación ligada al cromosoma X se produce en el gen *NEMO* (modifica-

dor esencial NFκB, conocido también como IKKγ (*inhibitor of kappa light chain enhancer kinase*; inhibidor de la cinasa potenciadora de la cadena ligera kappa) o en los genes autosómicos *CD40,* citidina desaminasa inducida por activación (*AID*) o uracilo-DNA glucosilasa *(UNG).* En estos casos, las células defectuosas son las B en lugar de las T.

La causa genética más frecuente del **síndrome de hiper-IgE** es una mutación del gen *STA73.* Además de las concentraciones elevadas de IgE, hay disminución de células Th17. El fenotipo de este síndrome también comprende varias características anatómicas distintivas, como articulaciones hiperextensibles y falla o retraso de la primera dentición, de modo que los pacientes presentan dos conjuntos de dientes.

Casos ocasionales de deficiencia funcional de las células T se originan por mutaciones en la cadena γ del complejo CD3, en los que los pacientes presentan niveles normales de células T circulantes, pero con una expresión reducida de receptores de células T sobre su superficie celular y mutaciones de la cinasa ZAP-70 que da como consecuencia cantidades reducidas de células T CD8+.

Algunas inmunodeficiencias pueden causar de modo paradójico una respuesta inmunitaria hiperactiva

Ya mencionamos que la producción excesiva de ciertas clases de anticuerpos (IgM o IgE, por ejemplo) puede ser el resultado de defectos génicos particulares. Ahora está claro que la "inmunodeficiencia" que afecta los mecanismos reguladores o de tolerancia producirá un incremento indeseable de tipos particulares de respuesta inmunitaria. Así, dada la función crítica de Foxp3 en la inducción de células T reguladoras, no sorprende que las mutaciones con pérdida de la función en el gen *Foxp3* tengan un efecto profundo y sean responsables del síndrome **IPEX** (desregulación *i*nmunitaria, *p*oliendocrinopatía y *e*nteropatía ligadas al cromosoma *X*), en el que la actividad no regulada de las células T conduce a una enfermedad autoinmunitaria multisistémica y con frecuencia mortal. El cuadro clínico algo menos grave conocido como **síndrome poliendocrino autoinmunitario 1** (APS-1, a veces conocido como APECED, sigla en inglés de poliendocrinopatía autoinmunitaria, candidiasis y distrofia ectodérmica) se debe a mutaciones en el gen *AIRE* que llevan a una tolerancia central inadecuada de las células T. Por el contrario, el APS-2 es genéticamente mucho más complejo, y como la enorme mayoría de las enfermedades autoinmunitarias (véase el Capítulo 18), no está causado por un único defecto génico.

Los defectos en Fas (CD95) o en el ligando Fas (CD95L) producen un **síndrome linfoproliferativo autoinmunitario** en el que hay apoptosis defectuosa de los linfocitos que producen cantidades aumentadas de células T CD4-CD8- (doble negativas) y el desarrollo de enfermedad autoinmunitaria.

Inmunodeficiencia combinada

En las deficiencias de células T primarias descritas antes, hay al menos algunas células T maduras presentes, aunque defectuosas desde el punto de vista funcional. Sin embargo, en la enfermedad por **inmunodeficiencia combinada grave** (IDCG) suele haber una falla absoluta en el desarrollo de las células T y, por consiguiente, la IDCG representa la forma más grave de la inmunodeficiencia primaria, que afecta a alrededor de uno de cada 80.000 nacidos vivos. Estos recién nacidos tienen defectos profundos en la inmunidad celular y humoral, y mueren en el curso del primer año de vida por infecciones oportunistas graves y recurrentes. Son frecuentes la diarrea prolongada, que es el resultado de las infecciones gastrointestinales, y la neumonía por *Pneumocystis jirovecii*; se observa el desarrollo intenso de *Candida albicans* en la boca o en la piel. Si son vacunados con microorganismos atenuados, generalmente los recién nacidos fallecen a causa de la infección progresiva.

Varios defectos en genes diferentes pueden ser los que determinan el desarrollo de la IDCG

Las mutaciones en varios genes diferentes pueden causar IDCG, lo que implica un bloqueo en el desarrollo de las células T junto con la deficiencia directa o indirecta de las células B. En algunos casos, también se produce la falla de desarrollo de las células NK (Figura 14.7).

Defectos en la vía de señalización de la citocina

Alrededor del 40% de los pacientes con IDCG tiene mutaciones en la **cadena común γ** ($γ_c$) de los receptores

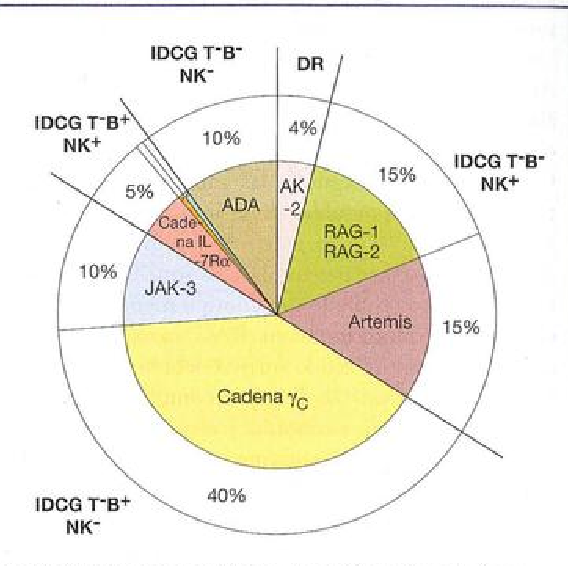


Figura 14.7. Defectos genéticos que determinan la inmunodeficiencia combinada grave (IDCG).

El fenotipo IDCG depende del defecto génico particular al cual responde. Por ejemplo, en el 15% de los casos de IDCG causada por la mutación del gen *Artemis* hay una falta completa de células B y T, pero las células NK están presentes (es decir, IDCG T-B-NK+), mientras que en el 10% de los casos debidos a defectos del gen *ADA* también faltan las células NK IDCG T-B-NK+). Las mutaciones en CD3δ, CD3ε, CD3ζ o CD45 (*) o el regulador de actina coronina-1A (†) determinan cada una <1% de los casos de IDCG. Las mutaciones en el gen *AK2* dan origen a la disgenesia reticular (DR). Puede haber algunos pocos casos de IDCG en los que los determinantes son otras mutaciones génicas.

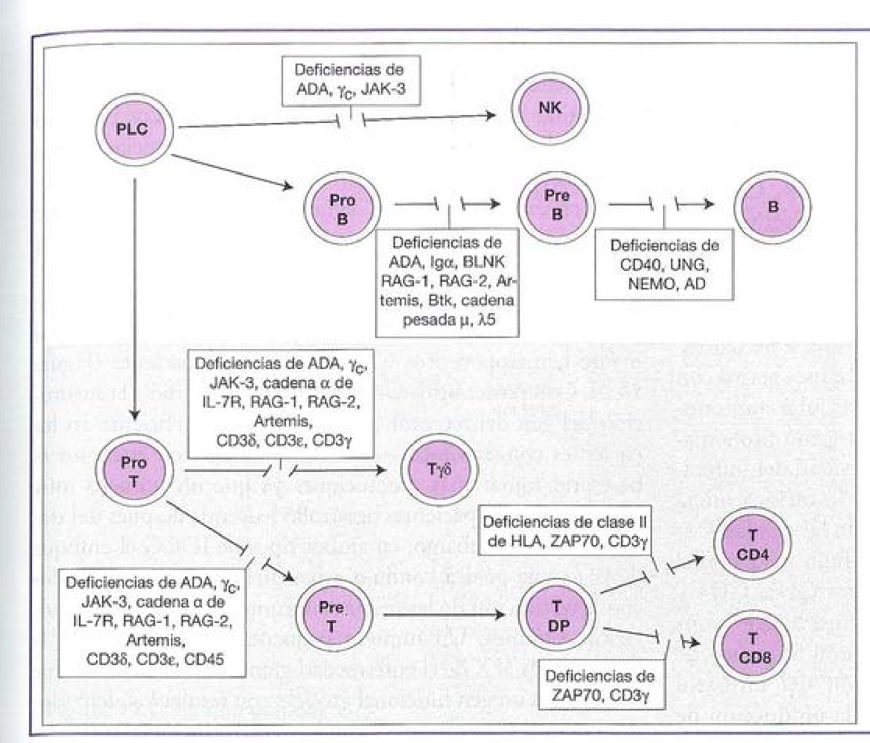


Figura 14.8. El bloqueo en el desarrollo de las células linfoides produce inmunodeficiencia.

El sitio y la naturaleza de la mutación determinarán la magnitud con la cual estará comprometida la función del producto génico. Así, aunque la herencia homocigota del gen mutado a menudo conducirá a un bloqueo absoluto en el desarrollo de poblaciones importantes de linfocitos, algunas mutaciones sólo causarán un bloqueo parcial. Además, incluso algunas mutaciones con pérdida de la función sólo anularán parcialmente la diferenciación de los linfocitos. Este es el caso de las deficiencias con cadena γ CD3 y clase II del HLA, donde las consecuencias suelen ser menos graves que en muchas otras inmunodeficiencias. ADA, adenosina desaminasa; AID, citidina desaminasa inducida por la activación; PLC, progenitor linfoide común; DP, doble positivo; RAG, gen activador de la recombinación.

para interleucinas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. De ellos, IL-7R es el más importante para la diferenciación de los linfocitos, y las mutaciones en la **cadena α IL-7R,** específica de la interleucina, o en **JAK3,** que transduce la señal γ_c, también causan IDCG (Figura 14.8).

La IDSC puede originarse a partir de una recombinación deficiente de VDJ

A diferencia de la acción solapada a través de las células T inmunocompetentes que acompaña a la deficiencia parcial de *RAG* en el síndrome de Omenn, las mutaciones disfuncionales importantes en las enzimas recombinasas, que catalizan la introducción de las dobles cadenas rotas, permiten la recombinación posterior de los segmentos *V, D* y *J* e impiden la aparición de linfocitos maduros (Figura 14.8). La falla del mecanismo de recombinación de *VDJ* es también una característica de las células radiosensibles provenientes de pacientes afectados de IDSC con el gen *Artemis* defectuoso. Este gen es un componente esencial del complejo proteincinasa dependiente del DNA que realinea y repara los extremos codificantes libres creados por las enzimas RAG.

Otras causas de IDCG

El 10% de los pacientes con IDCG tiene una deficiencia genética de la enzima que cataliza la degradación de las purinas, la adenosina desaminasa (ADA), la cual lleva a la acumulación del metabolito dATP, tóxico para las células progenitoras linfoides tempranas (Figura 14.8). La mutación de la cadena δ y ε del CD3 del complejo de receptor de células T origina un bloqueo en el desarrollo de estas células, en contraste con la deficiencia de la cadena γ del CD3 mencionada antes, que no impide la diferenciación de las células T pero que da lugar a la activación defectuosa de éstas. En casos muy raros, las mutaciones de la proteína tirosina fosfatasa CD45 también pueden causar IDCG. La **disgenesia reticular**, en la que hay mutaciones en el gen de la adenilato cinasa mitocondrial-2 *(AK2)*, es una variante rápidamente mortal de inmunodeficiencia combinada grave asociada con la falta de precursores de las células linfoides y mieloides.

Inmunodeficiencia combinada resultante del defecto hereditario del control de la función del linfocito

La **enfermedad linfoproliferativa ligada al cromosoma X** (XLP), o síndrome de Duncan, es una inmunodeficiencia progresiva caracterizado por fiebre, faringitis, linfadenopatía y disgammaglobulinemia (es decir, deficiencia selectiva de una o más, pero no de todas, las clases de anticuerpos). Los pacientes presentan una vulnerabilidad particular a la infección por el virus de Epstein-Barr (EBV). Las mutaciones se producen en el gen *SH2D1A* que codifica la SAP (proteína asociada a la molécula de señalización de la activación linfocítica: SLAM) que se une a la SLAM a través de su dominio SH2. Como la activación de SLAM conduce a la inducción intensa de IFNγ en las células T y actúa sobre las células B para incrementar la proliferación y la susceptibilidad a la apoptosis, las mutaciones en SAP que afectan adversamente la activación del SLAM debilitarán la respuesta inmunitaria, sobre todo respecto de la infección por EBV, en la que la replicación viral en las células B es controlada estrictamente por las células T del huésped.

Diagnóstico de las inmunodeficiencias

Los defectos en las inmunoglobulinas pueden evaluarse por estimaciones cuantitativas; las concentraciones arbitrarias de 2g/L definen el límite inferior normal práctico. La respuesta inmunitaria humoral puede ser valorada en pri-

mer lugar examinando en el suero la presencia de anticuerpos naturales (isohemaglutininas A y B, heteroanticuerpos contra eritrocitos de carnero, bactericidinas contra *E. coli*) para intentar luego inducir la inmunización activa antidiftérica, antitetánica, antipertussis y antipoliomielítica con virus muertos, pero no con virus vivos. CD19, CD20 y CD22 son los marcadores principales para cuantificar las células B por inmunofluorescencia.

Los pacientes con deficiencia de células T tendrán una reactividad disminuida o nula en las pruebas cutáneas para ciertos antígenos como tuberculina, candidina y de parotiditis. Se puede intentar la sensibilización cutánea activa con dinitroclorobenceno. La reactividad de las células mononucleares de la sangre periférica contra el mitógeno fitohemaglutinina es un buen indicador de la reactividad del linfocito T, de la misma manera que la reacción linfocítica mixta (véase el Capítulo 16). La cuantificación de las células T se logra con más facilidad por citometría de flujo mediante el empleo de anticuerpos monoclonales contra CD3, CD4 y CD8. También se dispone de pruebas in vitro para el complemento y para la actividad bactericida y otras funciones de los neutrófilos, mientras que la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) o la estimulación de la producción de superóxido proporcionan una medida de las enzimas oxidativas asociadas con la fagocitosis activa.

Tratamiento de las inmunodeficiencias primarias

La intervención temprana con antibióticos y antimicóticos es de fundamental importancia, con la opción de administrar antimicrobianos profilácticos en bajas dosis y a largo plazo para evitar la reinfección y las complicaciones posteriores, como sordera tras otitis media (infección del oído medio).

Sustitución de los componentes faltantes

Ya se mencionó que, si se dispone de un donante compatible, el tratamiento de elección es el trasplante de médula ósea, de células madre hematopoyéticas de sangre periférica o de sangre cordón umbilical, el cual permite la reconstitución de la respuesta inmunitarias en pacientes con diversas inmunodeficiencias primarias como IDCG, deficiencia de la adhesión de los leucocitos, enfermedad de Chédiak-Higashi y síndrome de Wiskott-Aldrich. En pacientes con IDCG ADA$^-$, para quienes no se dispone de donantes compatibles, la enzima faltante puede ser sustituida mediante inyecciones intramusculares semanales de ADA bovina conjugada a polietilenglicol; éste mejora notablemente la semivida biológica de la ADA, desde sólo algunos minutos para la enzima libre a 48-72 horas para el conjugado.

Las deficiencias que afectan las respuestas humorales pueden ser compensadas en alguna medida con la administración de inmunoglobulina intravenosa (IgIV) cada 3-4 semanas. Cuando están afectadas las respuestas innatas, puede resultar útil el tratamiento con citocinas, por ejemplo, mediante la inyección de interferón gamma para estimular a los fagocitos defectuosos en la enfermedad granulomatosa crónica.

Terapia génica

El tratamiento ideal cuando no se dispone de un trasplante compatible es la corrección del defecto génico. Los primeros ensayos de terapia génica para las inmunodeficiencias primarias se iniciaron hace más de 20 años y hubo un progreso continuo en este enfoque, con algunos contratiempos a lo largo del camino. La mayor parte de los pacientes tratados con este procedimiento sufría de IDCG ADA$^-$, en la que el gen normal para la ADA se insertó en un vector retroviral que luego fue utilizado para introducir el gen funcional en las células madre hematopoyéticas CD34$^+$ propias del paciente (Figura 14.9). Con posterioridad, este método se extendió a la sustitución del gen del receptor para la citocina γ_c deficiente en los pacientes con esta forma de IDCG, aunque en este caso es necesario tomar más precauciones ya que un número muy pequeño de esos pacientes desarrolló leucemia después del tratamiento. Sin embargo, en ambos tipos de IDCG el enfoque de la terapia génica condujo a beneficios clínicos sostenidos con la restitución de las respuestas inmunitarias frente a patógenos comunes. Un número pequeño de pacientes con la forma ligada al X de la enfermedad granulomatosa crónica fue tratado con un gen funcional *gp91^{phox}* con resultados alentadores. Los progresos futuros dependerán de las mejoras en el diseño de vectores para incrementar la eficacia y la seguridad de la transferencia de genes y una selección más precisa de los sitios de integración de éstos. Se ha propuesto el uso de vectores lentivirales que se autoinactivan (los lentivirus, que incluye el HIV, son una subfamilia de los retrovirus) e incorporan promotores específicos de tejidos, aunque aún deben determinarse su eficacia y su seguridad.

Inmunodeficiencia secundaria

La capacidad de respuesta inmunitaria puede ser deprimida de modo inespecífico por muchos factores. En particular, la IMC puede estar alterada en un estado de desnutrición, incluso del grado que puede encontrarse en las zonas urbanas de las regiones más desarrolladas del mundo. La deficiencia de hierro tiene una importancia particular en este aspecto, así como las deficiencias de cinc y de selenio.

Con cierta frecuencia, las infecciones virales son inmunosupresoras, y la disminución profunda en la inmunidad mediada por células que acompaña a la **infección sarampionosa** se atribuyó a la supresión específica de la producción de IL-12 por entrecruzamientos entre el virus y el CD46 de la superficie del monocito (el regulador del complemento también conocido como proteína del cofactor de membrana. El virus inmunosupresor más notorio, el de la inmunodeficiencia humana (HIV), se tratará en la próxima sección. En la lepra lepromatosa y en la infección palúdica, existen pruebas de una restricción de la capacidad de respuesta inmunitaria impuesta por la distorsión de las vías de tránsito linfoideo normal y, además, en el último caso, la función del macrófago parece ser aberrante. El trastorno del equilibrio entre las células Th1 y Th2 como resultado de la infección también puede deprimir las subpoblaciones más apropiadas para la protección inmunitaria.

Muchos agentes terapéuticos, como los rayos X, los fármacos citotóxicos y los corticosteroides, pueden tener efec-

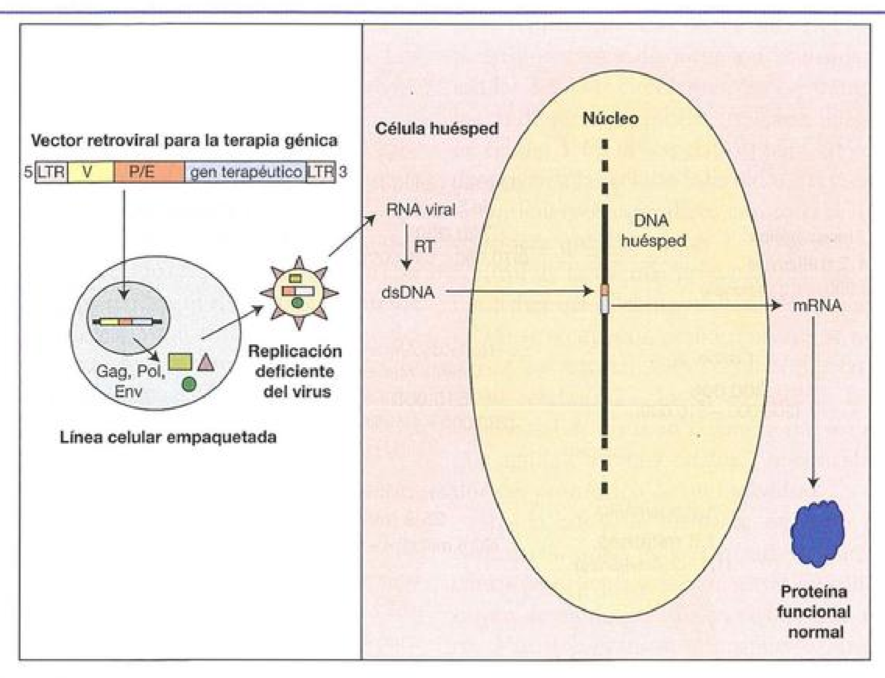


Figura 14.9. Terapia génica.

En un vector retroviral típico, los genes de Gag (proteína del core), Pol (transcriptasa inversa [RT]) y Env (envoltura viral) son reemplazados con el gen terapéutico, junto con las secuencias reguladoras adecuadas del promotor (P) y potenciador (E). Las repeticiones terminales largas 5' y 3' (LTR) incluyen secuencias que actúan en la integración del gen, y la secuencia ψ (psi) dirige el empaquetamiento del ácido nucleico viral. Las proteínas esenciales Gag, Pol y Env están disponibles en la línea celular empaquetada dentro de la cual se introduce el vector. Las partículas virales que se forman en esta línea celular carecerán de los genes para estas proteínas y, por consiguiente, no continuarán produciendo más partículas infecciosas tras la provisión del gen terapéutico a las células madre hematopoyéticas. En las células del paciente, el RNA viral se transcribe de modo inverso en DNA de doble cadena que con posterioridad se integra en el DNA cromosómico del huésped. El gen terapéutico puede entonces ser transcrito en mRNA para la producción de una forma funcional de la proteína previamente defectuosa.

tos devastadores sobre el sistema inmunitario. Los **trastornos linfoproliferativos de las células B**, como la leucemia linfocítica crónica, el mieloma y la macroglobulinemia de Waldenström, se asocian con grados variables de hipogammaglobulinemia y deterioro de las respuestas de anticuerpos. Sus infecciones comunes con bacterias piógenas contrastan con la situación en la enfermedad de Hodgkin en la que los pacientes despliegan todas las características distintivas de la IMC defectuosa, es decir, la susceptibilidad al bacilo de la tuberculosis, *Brucella*, *Cryptococcus* y virus herpes-zóster.

Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida)

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) es una enfermedad devastadora que produjo la muerte de más de 25 millones de personas hasta fines de 2008. Según el informe UNAIDS 2008, alrededor de 35 millones de personas son portadores en la actualidad del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), agente causal del sida (Figura 14.10). En 2008, sólo hubo cerca de 3 millones de infecciones nuevas. El epicentro de la infección es la región de África subsahariana, donde se informan casi las dos terceras partes de las infecciones por HIV de todo el mundo y una tasa de infección en adultos de alrededor del 5%. A fines de 2008, 14 millones de niños de la región subsahariana quedaron huérfanos a causa de esta enfermedad. Cada vez más, el HIV/sida presenta una faceta femenina; las mujeres mayores de 16 años representan cerca del 50% de todas las personas que viven con HIV o sida (más cerca del 60% en África subsahariana) y su tasa de infección es creciente. El otro grupo demográfico es el que corresponde a las personas jóvenes de 15-24 años, que representan cerca de la tercera parte de todos los infectados.

El primer caso informado de sida fue en 1981. El síndrome se caracterizaba por una predisposición a infecciones oportunistas, es decir, aquellas que son destruidas fácilmente por un sistema inmunitario que funciona de modo normal; la incidencia de una forma agresiva de sarcoma de Kaposi o linfoma de células B, y la depleción simultánea de células T $CD4^+$. Se sospechó que el sida era causado por un virus desconocido hasta ese momento, ya que se diseminaba a través del contacto con líquidos corporales, y en 1983 se aisló e identificó el HIV-1. En efecto, hay dos HIV estrechamente relacionados, HIV-1 y HIV-2, menos virulento, que difieren en su origen y su secuencia. La mayor parte de los casos de sida son causados por el HIV-1. El HIV-2 se encuentra sobre todo en el oeste de África.

Los virus HIV-1 y HIV-2 tienen sus orígenes en primates no humanos. Sobre la base de las similitudes de secuencias (Figura 14.11) con los virus de la inmunodeficiencia simia-

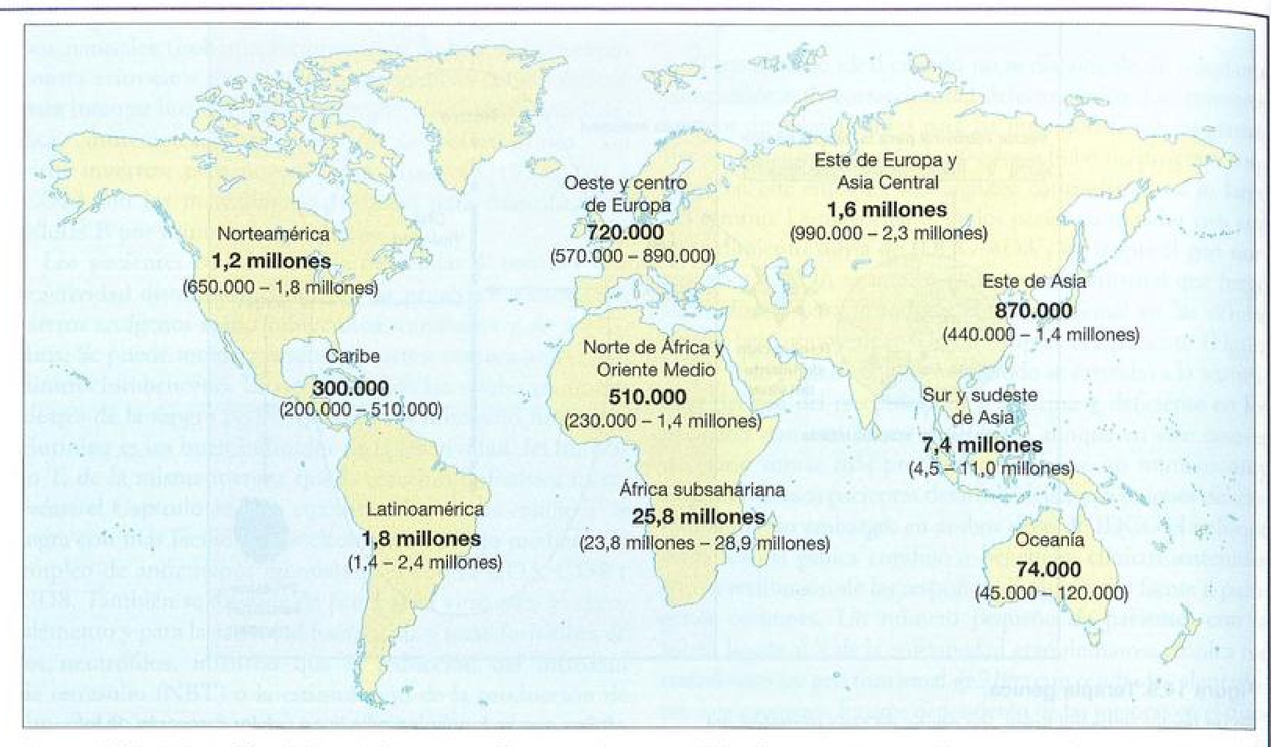
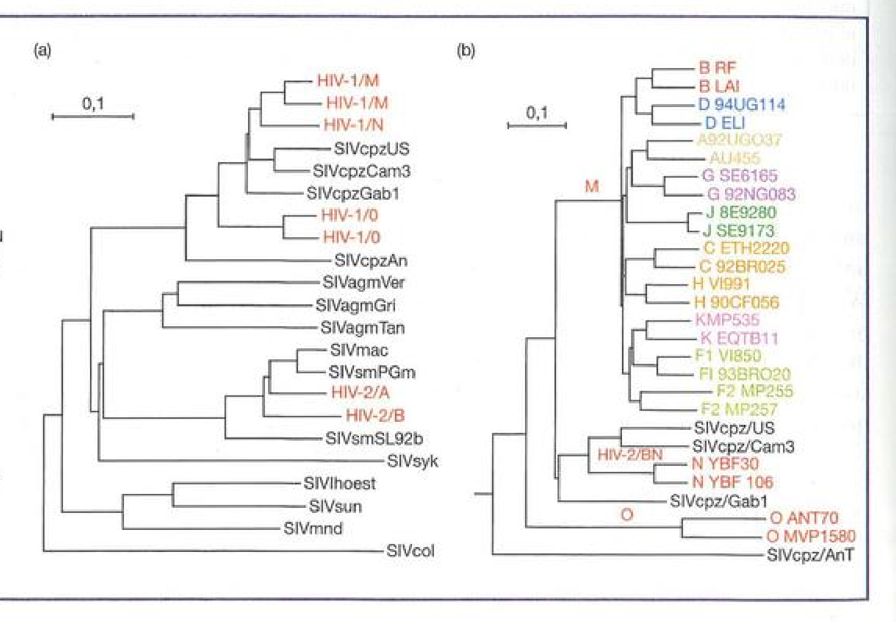


Figura 14.10. Estimación de los adultos y los niños que viven con HIV a fines de 2008 en diferentes regiones del mundo. Se considera que hay un total de 33,4 (31,1-35,8) millones de infectados (del sitio web UNAIDS, www.unaids.org).

Figura 14.11. Evolución de los virus del SIDA.

Se muestran dos árboles evolutivos en los que la barra de la escala indica la divergencia del 10% de la secuencia de proteínas. a) Árbol que muestra los orígenes de los lentivirus de primates. Las cepas SIV tienen un sufijo que denota su especie de origen, por ejemplo, SIV_{cpzUS} es el SIV proveniente de un chimpancé en cautiverio en Estados Unidos. Son evidentes los orígenes separados de HIV-1 y HIV-2 (mostrado en rojo). Este árbol se realizó mediante el empleo de las secuencias de la proteína Pol. b) Árbol que muestra la relación entre los grupos y clados del HIV-1 y el SIV_{cpz}. El árbol se estableció con el empleo de las secuencias de la proteína Env. (Cortesía de Paul Sharp; de P.M. Sharp [2002] *Cell* **108**, 305-312.)



na (SIV), es probable que el HIV sea el producto de la evolución de los virus SIV estrechamente relacionados que pasaron desde sus huéspedes primates no humanos al ser humano a comienzos o a mediados del siglo XX. El más afín con el HIV-1 es el SIVcpz, cuyo huésped natural es el chimpancé, *Pan troglodytes.* El HIV-2 está más relacionado con el SIVsmm del mono mangabeye gris, *Cercocebus atys.* Los estudios por mapeo filogenético y análisis de secuencia indican varias zoonosis independientes de SIV_{cpz} y SIV_{smm} en el siglo pasado. La hipótesis principal es que SIV_{cpz} y SIV_{smm} se transmitieron a los seres humanos a través de la exposición cutánea o de las mucosas a la sangre de animales infectados. Este escenario concuerda con la exposición regular directa a la sangre de primates de los cazadores que se dedican al comercio de carne de animales salvajes.

Sobre la base de las secuencias virales, el HIV-1 se clasifica en tres grupos: M (*main*; principal), O (*outlier*; atípico), N (no M, no O) y P (un virus recientemente descubierto probablemente transmitido a los seres humanos de los gorilas), y cada uno representa una zoonosis separada (Figura 14.11). HIV-2 se clasifica de modo similar en ocho grupos, de la A a la H. El HIV- 1 del grupo M se ha diseminado por

todo el mundo y se lo subclasifica en clados de la A a la K, según su predominio en diferentes regiones geográficas. Los otros tres grupos, N, O y P, están confinados a Gabón, Camerún y países vecinos del oeste de África.

La evolución de los diferentes clados del grupo M se produjo más probablemente dentro de la población humana tras un episodio de transmisión cruzada en especies. El descubrimiento de un aislamiento de HIV-1 de 1959, que parece ser un antecesor de los clados B y D, es coherente con este punto de vista. Además, el descubrimiento reciente de un segundo aislamiento de 1960 que es muy divergente del aislamiento de 1959 muestra que el virus ya había sufrido una importante diversificación hace 50 años. El antecesor común más antiguo del grupo M se estimó que data de la primera parte del siglo XX, lo cual sugiere que el HIV-1 infectó a los seres humanos desde hace mucho más tiempo de lo que se consideraba y que pasó inadvertido desde el punto de vista clínico en poblaciones del oeste y centro de África. La diseminación temprana de sida puede haber sido secundaria a diversos factores económicos, sociales y de comportamiento (p. ej., uso de agujas no esterilizadas para inyecciones parenterales y vacunaciones) que facilitan la transmisión del virus.

El HIV no suele causar sida inmediatamente y aún siguen las controversias acerca del modo preciso en que el virus daña el sistema inmunitario y si todos los individuos infectados por HIV-1 desarrollarán necesariamente la enfermedad. Desde la identificación del HIV se hicieron grandes adelantos, pero muchos aspectos siguen siendo un enigma y aún es difícil alcanzar la curación o elaborar una vacuna.

Evolución clínica de la enfermedad: de la infección al sida

La infección inicial suele producirse por la exposición a líquidos corporales provenientes de un individuo infectado. El HIV se encuentra como partículas virales libres y en células infectadas del semen, la secreción vaginal y la leche materna. En la actualidad, la vía de transmisión más común en todo el mundo es a través de las relaciones sexuales. El uso de agujas contaminadas para la administración de drogas intravenosas y el empleo de sangre o sus derivados con fines terapéuticos también son medios frecuentes de infección por HIV. La detección sistemática del virus en productos de la sangre ha eliminado casi por completo la vía de transmisión por sangre humana infectada en los países desarrollados. Otra vía importante de transmisión es de las madres infectadas a sus hijos. Las madres pueden transmitir el HIV a sus hijos durante el nacimiento o la lactancia. En África, la tasa de transmisión perinatal es de alrededor del 25%; la posibilidad de este tipo de transmisión puede disminuirse significativamente si la madre recibe tratamiento antirretroviral.

Dos a ocho semanas después de la infección (Figura 14.12), el 80% de los individuos experimenta viremia aguda. Los síntomas recuerdan a los de la gripe y consisten en fiebre alta en picos, odinofagia, cefaleas y ganglios linfáticos agrandados. Esto se conoce como síndrome retroviral agudo, cuyos síntomas suelen remitir en forma espontánea en 1 a 4 semanas. Durante la fase aguda, hay una explosión de la replicación viral, sobre todo en las células T CD4+ del intestino, y una disminución marcada equivalente en las células T CD4+ circulantes. En ese momento, la mayoría de los individuos también muestra una respuesta intensa de células T CD8+ específicas para HIV (Figura 14.12) que destruyen a las células infectadas, seguida por la producción de anticuerpos específicos contra HIV (seroconversión). Se considera que las células T CD8+ son importantes para el control de la viremia primaria. Los niveles de virus aumentan y después disminuyen cuando los recuentos de células T CD4+ se recuperan, pero los niveles se mantienen por debajo de lo normal (800 células/mL en comparación con 1200 células/mL). En la actualidad, la persistencia de un nivel basal de virus en la sangre tras los síntomas de la viremia aguda ("viremia estable") se considera el mejor indicador del pronóstico de un individuo.

Tras la infección primaria, sigue un período de latencia clínica (síntomas escasos o nulos), durante el cual el HIV continúa su replicación mientras las células T CD4+ disminuyen de modo gradual en cuanto a su función y su número. Varios mecanismos propuestos tratan de explicar la depleción de las células T CD4+ durante la infección por HIV. Primero, hay efectos citopáticos directos del virus sobre su célula T huésped. Segundo, las células infectadas presentan una mayor susceptibilidad a la inducción de la apoptosis. Tercero, el efecto "espectador" puede conducir a la desaparición de las células no infectadas por la exposición a productos o moléculas virales que conduce a la activación del sistema inmunitario. Por último, se produce la eliminación de las células T CD4+ infectadas por las células T CD8+ que reconocen los péptidos virales presentados por las moléculas de clase I del CMH.

En el transcurso de los años, la gran mayoría de los infectados por HIV progresa al sida. El período asintomático dura de manera característica entre 2 y 15 años; sin embargo, el número de células T CD4+ funcionales declina finalmente por debajo de un umbral (cerca de 400 células/mL) y comienzan a aparecer las infecciones oportunistas. Una vez que el recuento de células T CD4+ disminuye a menos de 200 células/mL, se considera que el individuo padece sida.

En los estadios tempranos de la enfermedad por HIV-1, los microorganismos oportunistas típicos que evaden el sistema inmunitario celular deteriorado son las especies de *Candida* y *Mycobacterium tuberculosis*, que se manifiestan como muguet bocal y tuberculosis, respectivamente. Más tarde, los pacientes a menudo experimentan una infección herpética (culebrilla) por la activación del virus varicela-zóster latente a partir de una varicela anterior. También es habitual el desarrollo de linfomas de células B inducidos por EBV y sarcoma de Kaposi, un cáncer de células endoteliales, probablemente por los efectos de las citocinas secretadas en respuesta a la infección por HIV y un herpes virus nuevo (HHV-8) encontrado en estos tumores. La coinfección de hepatitis C/HIV también es frecuente, y la progresión de la enfermedad debida a la hepatitis C sigue un curso acelerado. La neumonía causada por el hongo *Pneumocystis jirovecii* es frecuente en los pacientes, y antes de la introducción de la terapéutica antimicótica eficaz era a menudo mortal.

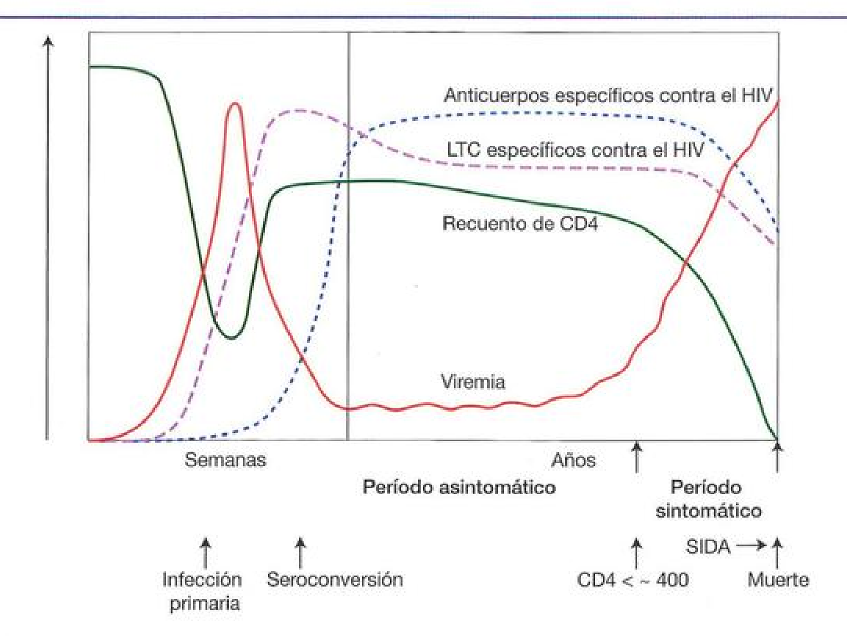


Figura 14.12. Evolución típica de la infección por HIV.

La infección primaria se caracteriza por la elevación rápida de la viremia y la disminución rápida de las células T CD4+ circulantes. Los niveles de virus en plasma alcanzan un máximo y disminuyen hasta un nivel bastante constante ("viremia estable"), que es pronóstico del tiempo de progresión de la enfermedad. El recuento de células T CD4+ se recupera un tanto, pero en un nivel más bajo que antes de la infección. La respuesta de células T CD8+ específicas para el HIV se activa a medida que el virus aumenta y es probable que sea importante en el control de la infección primaria. La respuesta de anticuerpos específica para el HIV tarda algo más en comenzar y produce la seroconversión. La respuesta de anticuerpos neutralizantes demora aún más en iniciarse (véase la Figura 14.17). Tras la infección primaria, sigue un período de latencia clínica de alrededor de una década. No se observan síntomas pero continúa la depleción de células T CD4+ en los tejidos linfoides. Por último, la depleción de células T CD4+ es tan pronunciada que comienza a decaer la resistencia a las infecciones oportunistas, y por último se produce el colapso completo del funcionamiento del sistema inmunitario y la muerte. La intervención con fármacos puede mantener las cargas virales plasmáticas por debajo del nivel de detección e impide la depleción de células T CD4+.

En los estadios finales del sida, los patógenos más importantes que causan infección son *Mycobacterium avium* y citomegalovirus. Las infecciones respiratorias constituyen la principal causa de muerte en los afectados por sida. Aunque las infecciones y los cánceres mencionados antes son típicos, no todos los pacientes con sida desarrollan esas enfermedades, como también pueden presentar otros tumores e infecciones, aunque menos importantes.

El tiempo de progresión desde la infección por HIV al sida es dispar debido a las variaciones genéticas del virus, del huésped o de ambos. Por ejemplo, algunos virus están naturalmente atenuados y se asocian con la progresión más lenta de la enfermedad. El tipo HLA del huésped puede ser importante. La homocigosidad de clase I del HLA se relaciona con una progresión más rápida, tal vez por la respuesta menos diversa de las células T contra la infección. Ciertos tipos de HLA se asocian con pronósticos diferentes: con el HLA-B57 y el HLA-B27 la progresión es más lenta, mientras que con el HLAB35 es más rápida. Asimismo, hay individuos que son sumamente resistentes a la infección por HIV porque tienen una mutación en el receptor para quimiocina CCR5 que actúa como correceptor para el HIV, como se describirá más adelante.

Dos grupos de personas plantean un interés particular para los investigadores por su capacidad para permanecer exentos de enfermedad tras la exposición al HIV. El primer grupo está representado por individuos claramente infectados por el virus, pero que controlan la replicación viral en niveles muy bajos y no progresan a la enfermedad. Dentro de este grupo, algunos individuos se conocen como "controladores de elite". El segundo grupo está compuesto por individuos seronegativos que han estado repetidamente expuestos al HIV, pero que no experimentan enfermedad y no tienen virus detectable. Es intrigante que algunos de los miembros de este último grupo tengan células T CD8+ específicas para el HIV, que supone la exposición previa al virus o al menos a antígenos virales no infecciosos. No está claro si la respuesta inmunitaria observada en ellos determina la resolución de la infección por HIV. No obstante, estos individuos constituyen el foco de interés para el diseño y el desarrollo de la vacuna. A continuación se examinarán los aspectos fundamentales del virus en sí, como el tropismo celular, el genoma y el ciclo vital.

Genoma del HIV-1

El HIV-1 es un retrovirus, lo cual significa que tiene un genoma de RNA pero que la replicación pasa a través del DNA con la participación de la enzima transcriptasa inversa. Pertenece al grupo de los retrovirus denominados lentivirus (del latín "lentus"), que significa "virus lentos" debido al curso tardo de la enfermedad asociada con la infección

LTR
Repetición terminal larga (long terminal repeat)
- Contiene regiones control que se unen a los factores de transcripción del huésped (NFκB, NFAT, Sp1, TBP)
- Requerida para la iniciación de la transcripción
- Contiene el RNA elemento de respuesta a la transactivación (TAR) que se une a Tat

vif
Factor de infectividad viral (viral infectivity factor) (p23)
- Disminuye las reservas intracelulares de factores antirretrovirales APOBEC3G, por esto bloquea la incorporación al virión de este factor

vpu
Proteína viral U (viral protein U)
- Estimula la degradación de CD4 e influye en la liberación del virión

env
Proteína de envoltura gp160
- Se escinde en el retículo endoplasmático a gp120 (SU) y gp41 (TM)
- gp120 media la unión del receptor CD4 y del receptor de quimiocina mientras que gp41 media la fusión
- Contiene el elemento de respuesta de RNA (RRE) que se une a Rev

nef
Efector negativo (negative effector) (p24)
- Estimula la inhibición de la expresión de CD4 y de moléculas de clase I del CMH de la superficie
- Bloquea la apoptosis
- Aumenta la infectividad del virión
- Altera el estado de activación celular
- La progresión a la eç se retrasa de modo significativo en ausencia de Nef

5' U3 R U5 ... U3 R U5 3'

gag
Pr55[gag]
- Poliproteína procesada por PR
- MA, Matriz (p17)
  Sufre miristilación que ayuda a guiar la poliproteína Gag a la balsa de lípidos; implicado en la importación nuclear del HIV complejo de preintegración (PIC)
- CA, Cápside (p24)
  Se une a la ciclofilina A
- NC, Nucleocápside (p7)
  Dedo de Zn; proteína de unión al RNA
- p6
  Interactúa con Vpr; contiene el dominio tardío (PTAP) que se une a TSG101 y participa en los pasos finales de brotación del virión

pol
Polimerasa
- Codifica varias enzimas virales, como PR (pl0), RT y RNAsa H (p66/51) e IN (p32) procesadas en su totalidad por PR

vpr
Proteína viral R (viral protein R) (p15)
- Estimula la detención del ciclo celular G2
- Facilita la infección por HIV de los macrófagos

rev
Regulador de la expresión génica viral (p19)
- Se une a RRE
- Inhibe el corte y empalme del RNA viral y estimula la exportación nuclear de los RNA virales que sufrieron procesos incompletos de corte y empalme

tat
Activador transcripcional (transcriptional activator) (p14)
- Se une a TAR
- En presencia de la ciclina T1 y CDK9 del huésped, aumenta la elongación de la RNA Pol II sobre el molde de DNA viral

Figura 14.13. Genoma del HIV-1.

Se muestra la organización del genoma y se resumen las funciones de los productos génicos. (Gentilmente provista por Warner Greene; de Greene W.C. y Peterlin B.M. [2002] *Nature Medicine* **8**, 673-680.)

por estos virus. El genoma del HIV-1 está constituido por alrededor de 9 kb de RNA, que forman nueve genes diferentes codificadores de 15 proteínas. Dos copias de genoma de cadena simple están empaquetadas en la partícula viral junto con otras enzimas y proteínas accesorias. Tres de los marcos de lectura codifican las poliproteínas Gag (*group specific antigen*: antígeno específico de grupo), Pol (polimerasa) y Env (envoltura), que son escindidas de modo proteolítico en proteínas estructurales y enzimas individuales (Figura 14.13). Gag es desdoblada en cuatro proteínas estructurales, MA (matriz), CA (cápside), NC (nucleocápside) y p6, mientras que Env se divide en dos, SU (gp120 de superficie) y TM (gp41 de transmembrana). La escisión de Pol produce las enzimas PR (proteasa), RT (transcriptasa inversa) e IN (integrasa), que están encapsuladas en la partícula viral. También se codifican varias proteínas accesorias, tres de las cuales, Vif, Vpr y Nef, se hallan empaquetadas dentro de la partícula viral. Las proteínas accesorias restantes son Tat, Rev y Vpu. En la Figura 14.13 se resumen las funciones de las 15 proteínas del HIV y a continuación se las trata en relación con el ciclo vital del HIV.

Ciclo vital del HIV-1

Entrada del virus

Se cree que la adherencia inicial del virus a la célula está mediada sobre todo por interacciones inespecíficas entre las espículas de la envoltura que se encuentran en la superficie del virus y las moléculas diana de la superficie de la célula T. La espícula de la envoltura es un trímero de heterodímeros compuesto por subunidades de glucoproteína de superficie (gp120) y glucoproteína transmembrana (gp41) asociadas de modo no covalente. Es probable que los grupos funcionales de azúcar y las placas con carga positiva de la gp120 medien la unión con las lectinas de la superficie celular y con los proteoglucanos de sulfato de heparán de carga negativa, respectivamente.

El primer acontecimiento de unión específico del receptor tiene lugar cuando la gp120 de las espículas de la envoltura viral ocupan el CD4 de la superficie de la célula T diana (Figura 14.14). El HIV-1 infecta de modo específico células que expresan CD4, como linfocitos T, macrófagos y células dendríticas. CD4 se une con alta afinidad en una cavidad de gp120, como lo reveló una estructura de gp120 en complejo con CD4. Esta unión activa múltiples cambios en la conformación de la gp120, que queda expuesta y forma el sitio de unión del correceptor. Este es, con más frecuencia, el receptor para quimiocina CCR5 o CXCR4. Estos receptores actúan en la quimiotaxis, en la que las células inmunitarias se movilizan por gradientes de moléculas de quimiocina hacia los sitios de inflamación. Los HIV-1 se agrupan a menudo de acuerdo con el correceptor que usan. Los virus R5 utilizan CCR5, los virus X4 emplean CXCR4, y los virus con tropismo dual R5X4 utilizan CCR5 y CXCR4. Los virus R5 sólo requieren niveles bajos de CD4 expresados en la superficie de las células T diana, mientras

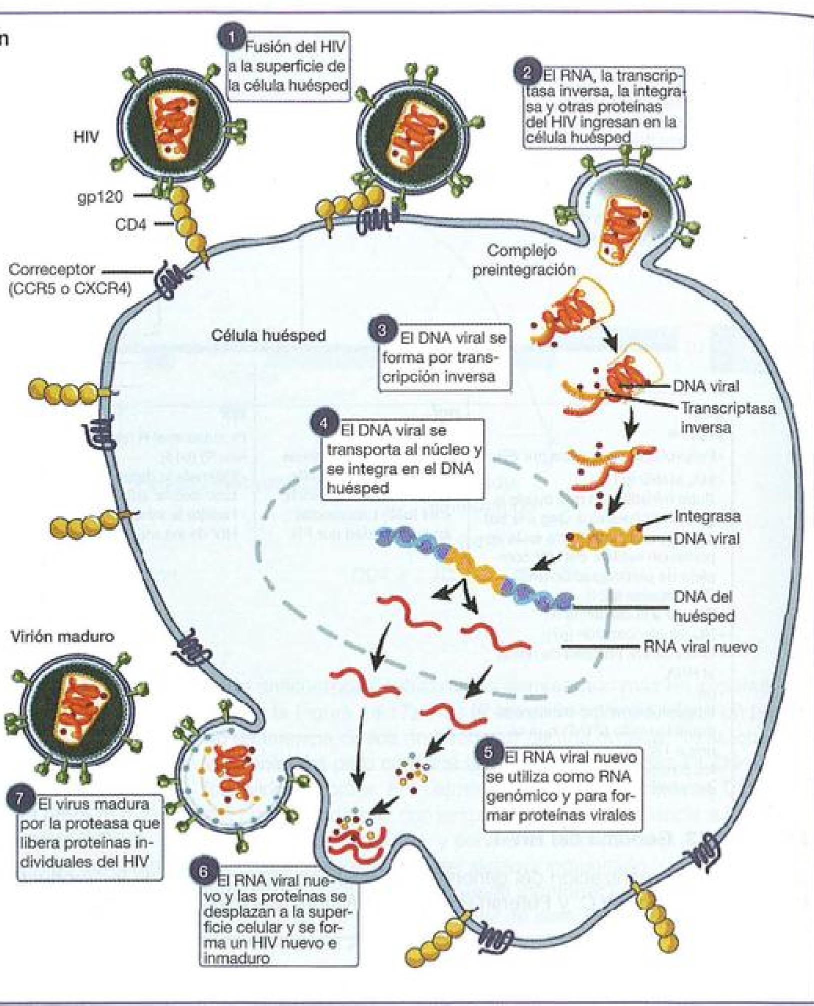


Figura 14.14. Pasos del ciclo de replicación del HIV (gentileza de NIAID).

que el virus X4 necesita niveles más elevados. De este modo, la expresión diferencial de CD4 y de los correceptores hace que los diferentes tipos de células T (o subtipos) sean más susceptibles a la infección por los virus X4 o R5: el virus X4 infecta células T vírgenes CD4+ y células dendríticas maduras, mientras que las células diana preferidas *in vivo* del virus R5 son las células dendríticas inmaduras, los macrófagos y las células T CD4+ efectoras o de memoria activadas. Al comienzo, cuando las variantes se clasificaban sobre la base de las líneas celulares en las que podían crecer *in vitro*, las variantes de R5 se denominaban "con tropismo por los macrófagos" y el virus X4 como "linfotrópico". Estas designaciones antiguas para las variantes del HIV son confusas, ya que el virus R5 infecta linfocitos, y por consiguiente, fueron modificadas para reflejar el uso del correceptor.

La unión del correceptor induce cambios conformacionales en la glucoproteína transmembrana, gp41, que dan como resultado la exposición del péptido de fusión N-terminal altamente hidrófobo de la gp41, antes enclavada en la estructura de la espícula. El péptido de fusión se inserta en la membrana de la célula T huésped como un arpón, y ambos desestabilizan la membrana de la célula T diana y generan un intermediario de fusión gp41 alfa helicoidal extenso, designado "intermediario prehorquilla". Este intermediario es inestable y se colapsa con facilidad sobre sí mismo para formar un haz de seis hélices, u "horquilla", que comprende tres hélices α internas dispuestas de modo antiparalelo con tres hélices α externas. La única estructura de alta resolución de la gp4l disponible hasta la fecha es la de la gp41 en su supuesta forma posfusión. Se considera que el colapso de gp41 en este haz de seis hélices extremadamente estable proporciona la fuerza impulsora termodinámica para la fusión. Los haces de seis hélices representan un motivo estructural común entre otras proteínas de fusión virales y celulares; otros virus que tienen proteínas de superficie con similitudes estructurales a la gp41 son el virus influenza, SRAG y Ébola. Aunque no se conoce bien el modo por el cual la formación del haz de seis hélices posibilita la fusión de las membranas celular y viral, si aquélla se impide mediante análogos peptídicos que compiten con la ocupación de las α-hélices, la fusión también es abolida. Uno de estos péptidos se utilizó como fármaco para el HIV, el primero de una clase nueva de agentes: los inhibidores de la entrada viral.

La fusión es un proceso altamente participativo que sucede en el término de minutos, y se propuso que para que sea eficaz puede requerir la interacción de varias espículas con los receptores y correceptores correspondientes.

Tras la fusión, la partícula viral pierde su envoltura exterior pero conserva el core viral o complejo de transcripción inversa. Este complejo está compuesto por dos RNA virales, RT, IN, tRNALys, matriz (p17), nucleocápside (p7), proteína de la cápside (p24) y Vpr.

Transcripción inversa e integración

En su camino hacia el núcleo, la RT utiliza las dos moléculas de RNA de cadena simple encerradas dentro del core viral como molde para convertir el genoma viral en una copia de cDNA de doble cadena. La RT no tiene un mecanismo de corrección e introduce alrededor de una mutación por genoma y por transcripción inversa. La RNAsa H degrada el molde de RNA a medida que se sintetiza la hebra negativa de DNA, y la DNA polimerasa cataliza la generación de un genoma viral cDNA de doble cadena.

Tras la transcripción inversa, el complejo contiene en esencia los mismos factores que antes, salvo que el genoma RNA fue sustituido por un genoma cDNA recién sintetizado. Este complejo se conoce como complejo de preintegración, que se transloca al núcleo, tal vez a través de los microtúbulos por un mecanismo que sólo se conoce en parte y que le confiere su gran tamaño.

En la integración del genoma cDNA viral en el genoma de la célula T participan la integrasa y varias proteínas del huésped (Figura 14.14). Requiere la secuencia LTR viral y se dirige de manera preferente a las áreas de transcripción activa. La integración puede conducir a un cDNA viral latente o activo desde el punto de vista transcripcional denominado provirus. El provirus activo sirve como molde para la replicación y la transcripción virales. La latencia explica la ineficacia de las terapéuticas antivirales empleadas hasta la fecha para eliminar por completo el virus de los individuos infectados y es el gran desafío para la curación total del HIV. El número de células infectadas en forma latente en un individuo infectado es muy pequeño, del orden de 10^5-10^6.

Replicación

La replicación del virus comienza después de la integración con la producción de transcritos virales nacientes por las RNA polimerasas celulares (Figura 14.14). La transcripción está regulada por proteínas que se unen dentro de las secuencias LTR, los cuales flanquean el genoma viral. Por ejemplo, la activación de las células T produce la expresión del factor de transcripción NFκB, que se une a diversos promotores celulares como los que se encuentran dentro de la LTR 5'.

La producción de las proteínas virales es bifásica. Durante la fase temprana (también conocida como fase independiente de Rev), los transcritos virales son procesados por completo (es decir, se utilizan todos los sitios de corte y empalme internos), poliadenilados y exportados al citoplasma como todos los otros transcritos celulares. La traducción de estos transcritos da por resultado tres productos génicos: Tat, Rev y Nef. Al igual que otros virus, el HIV-1 utiliza por completo un molde único y, en consecuencia, para que se expresen otros genes, se utilizan patrones de corte y empalme alternativos (cuatro sitios de corte y empalme 5' diferentes, ocho sitios de corte y empalme 3' diferentes); sin embargo, esto no puede suceder hasta que se alcanza un umbral crítico de Rev en el núcleo. Una señal de localización nuclear en el N-terminal de Rev los guía de nuevo al núcleo tras la traducción con la ayuda del factor celular importina β. Este dominio con alto contenido de arginina también actúa como sitio de unión para un RNA diana, el elemento de respuesta Rev (RRE), que se localiza en el intrón env de todos los mRNA que han sufrido cortes y empalmes incompletos. Los cortes y empalmes de los transcritos de HIV por factores celulares específicos para esta función es un proceso ineficaz y da tiempo para que Rev se una a RRE. La proteína Rev se multimeriza cooperativamente (hasta 12 monómeros Rev adicionales) a lo largo del RNA y este complejo Rev-RRE se asocia con exportina/Crm-1 por medio de una señal de exportación nuclear en el extremo C-terminal de Rev. Esto permite el transporte eficaz de los transcritos que sufrieron cortes y empalmes parciales o ninguno desde el núcleo hacia el citoplasma antes de que los factores de corte y empalme puedan procesar los transcritos.

Estas acciones llevadas a cabo por Rev permiten que comience la segunda fase de expresión génica y que los mRNA que sufrieron cortes y empalmes parciales o ninguno se traduzcan en Env, Vif, Vpr y Vpu, y Gag y Gag-Pol, respectivamente. Esta es una adaptación fundamental por parte del virus ya que los transcritos con los intrones son normalmente retenidos y degradados si no pueden ser procesados. Sin Rev, el HIV-1 no puede transportar su material genético (que contiene múltiples intrones) al citoplasma donde se ensamblan las partículas virales recién sintetizadas; de hecho, en experimentos en los que se elimina Rev del genoma, los clones de virus resultantes tienen una replicación incompetente.

Las proteínas Tat y Nef también son cruciales en la replicación del HIV. En ausencia de Tat, la transcripción comienza pero la polimerasa no puede producir la elongación eficaz a lo largo del genoma viral. Tat se une a una estructura bien definida del RNA, recluta factores de elongación positivos y estimula la tasa de replicación viral. Nef actúa de un modo diferente a Tat y Rev; no se une directamente al RNA viral, sino que actúa en el ambiente de la célula infectada para favorecer la replicación. Las actividades de Nef consisten en afectar las cascadas de señalización, regular negativamente la expresión de CD4 en la superficie de la célula infectada y estimular la generación de más viriones infecciosos y la diseminación del virus. Además, Nef reduce las respuestas inmunitarias contra el HIV e inhibe la apoptosis, por lo cual prolonga la vida de la célula infectada y aumenta la replicación viral. Es sorprendente el número de mecanismos por los cuales el HIV estimula su propia reproducción. Refleja el rápido recambio y la infidelidad inherente en la replicación del HIV. El virus reveló cantidades enormes de interacciones proteína-proteína y proteína-ácidos nucleicos en su "danza" con los seres humanos, y la presión de selección da lugar a interacciones que beneficien su supervivencia y su expansión. Esta es una evolución en el tiempo mucho más corta que la que suele experimentarse.

Ensamblaje, brotación y maduración del virus

El ensamblaje de la partícula viral nueva tiene lugar en la membrana citoplasmática de la célula infectada (Figura 14.14). Una de las proteínas virales traducida en el citosol durante la fase tardía de la expresión génica es la proteína precursora Gag p55, que se dirige a la membrana citoplasmática o a los endosomas tardíos y se adhiere a la bicapa

lipídica donde están adheridas las glucoproteínas Env por el ancla transmembrana de gp41. El ensamblaje depende de la proteína celular HP68 que se une a p55 y estimula la formación de un core viral inmaduro. Otras proteínas estructurales del virus se ensamblan en la membrana celular con dos copias de RNA del genoma viral, RT, proteasa e integrasa para integrarse en una partícula viral inmadura. Una de las proteínas estructurales fundamentales es la p6, que vincula el core del virus con los componentes del complejo de clasificación endosómica (*endosomal sorting complex*) en los sitios de brotación de la membrana citoplasmática y los endosomas tardíos. Justo antes de la brotación, pueden incorporarse al virión otros factores del huésped como los factores de restricción citoplasmáticos virales, entre los que se cuenta APOBEC3G. En coincidencia con la brotación del virión inmaduro desde la membrana citoplasmática, se produce el procesamiento proteolítico de la cápside, que genera la partícula viral madura.

APOBEC3G es una molécula interesante que puede restringir la replicación viral mediante la desaminación de la cisteína del DNA y la pérdida resultante de la funcionalidad de los genomas virales. La proteína Vif del HIV-1 se une a APOBEC3G y, al dirigirla para la degradación profesional, reduce su incorporación en los viriones. APOBEC3G está expresada en células primarias, como linfocitos y macrófagos, y como consecuencia, Vif es esencial para la replicación viral en estas células.

Otro factor de restricción importante del HIV-1 es *Trim5α*, que determina la resistencia de las células de primates a diversas infecciones por retrovirus. Tiene como diana la proteína de la cápside y bloquea un paso temprano de la infección retroviral antes de la transcripción inversa. Por último, la teterina es una molécula que puede suprimir la liberación del virus desde la células infectadas; su acción puede ser contrarrestada por la proteína Vpu del HIV-1.

Para concluir, es importante señalar que probablemente gran parte de la propagación de la infección *in vivo* por HIV-1 se deba a la diseminación entre células en lugar de partículas virales libres. Las proteínas Env de la superficie de la célula infectada ocupa los receptores sobre células T diana vecinas, pero la transferencia del HIV-1 requiere la brotación del virus. Al parecer, las partículas del HIV-1 se transfieren de modo direccional a través de sitios de contacto entre células T infectadas y no infectadas con una disposición que se ha denominado sinapsis virológica y tiene similitudes con las sinapsis inmunitarias entre células T y dendríticas. Nef estimula la formación de estas sinapsis entre macrófagos y células T infectadas.

Transmisión vaginal del HIV y estadios tempranos de la infección

En la actualidad, las infecciones por HIV son contraídas en su mayor parte a través de la transmisión heterosexual, con más frecuencia por coito vaginal. En consecuencia, el interés se centró en la dilucidación del modo en que tiene lugar la transmisión vaginal y en cuáles son las intervenciones que pueden realizarse para prevenirla. El modelo SIV/mono ha sido muy útil en este aspecto (Figura 14.15). Al parecer, el virus lucha contra las condiciones adversas durante los estadios tempranos de la infección, pero una vez que logra afianzarse, las circunstancias cambian con rapidez a favor del virus hasta el punto en que, sin la farmacoterapia, la progresión de la enfermedad se hace casi inevitable.

El primer problema que encuentra el virus es la barrera de las mucosas. Si está lesionada, por ejemplo, por enfermedades genitales ulcerativas, vaginosis bacteriana o el empleo de ciertos microbicidas como nonoxinol-9, los índices de transmisión aumentan de manera significativa. Si la barrera se encuentra en gran parte intacta, muy pocos virus la atravesarán, posiblemente por brechas pequeñas o por el transporte por células dendríticas (DC). Estas células expresan lectinas de tipo C, como DC-SIGN y DC-SIGNR, que se unen a los glucanos de manosa dispuestos en la superficie de la gp120; de este modo atrapa a los viriones que pueden ser incorporados al compartimiento no lisosómico a un pH bajo, donde permanecen como infecciosos. Una vez que atraviesa la barrera, el virus libre infecta a las células T diana, como las células T CD4+, los macrófagos y las células dendríticas de la lámina propia. El virus infeccioso dentro de las células dendríticas puede ingresar en las célula T CD4+ en reposo y activadas mediante conjugados de célula T y células dendríticas, ya que se observan estallidos de replicación viral en las sinapsis entre estas células. Además, la sobreexpresión inducida por Nef del HIV-1 de DC-SIGN y quimiocinas β en las células dendríticas puede estimular la agrupación de linfocitos y la diseminación viral. Otro estudio sugiere que Nef también puede alterar las características fisiológicas de los macrófagos infectados y favorecer de este modo las condiciones para la diseminación viral.

No obstante, en este momento sólo hay una pequeña población inicial de células infectadas, que debe diseminar la infección a un número relativamente pequeño de células susceptibles dispersadas en la mucosa. La infección aún es débil y probablemente sea susceptible a la intervención terapéutica. Luego, en el curso de un día a una semana, el virus encuentra su camino hacia el tejido linfoide, una fuente con alto contenido de células T CD4+ activadas. Ahora, las condiciones lo favorecen al virus puesto que las grandes cantidades de células T diana estrechamente agrupadas conducen a una elevación muy rápida de la producción de virus para causar valores máximos de la viremia. Un compartimiento muy importante de tejido linfoide es la lámina propia del intestino donde se produce la muerte masiva de las células T CD4+ de memoria, sea por destrucción directa o por medio de la apoptosis. Se ha descrito el contraataque del sistema inmunitario del huésped como "demasiado escaso, demasiado tardío".

Terapéutica contra el HIV-1

En los últimos años, se realizaron grandes adelantos para la contención de la replicación del HIV en los infectados y para disminuir o impedir la progresión al sida. Se dispone de un número grande de fármacos nuevos. Muchos de los pasos en el ciclo vital del virus son dianas potenciales para los agentes terapéuticos, como: a) entrada, b) fusión, c) transcripción inversa, d) integración, e) transcripción/transactivación, f) ensamblaje y g) maduración.

En la actualidad, se utilizan cinco clases de fármacos que se dirigen a cuatro pasos del ciclo vital. La primera clase de anti-

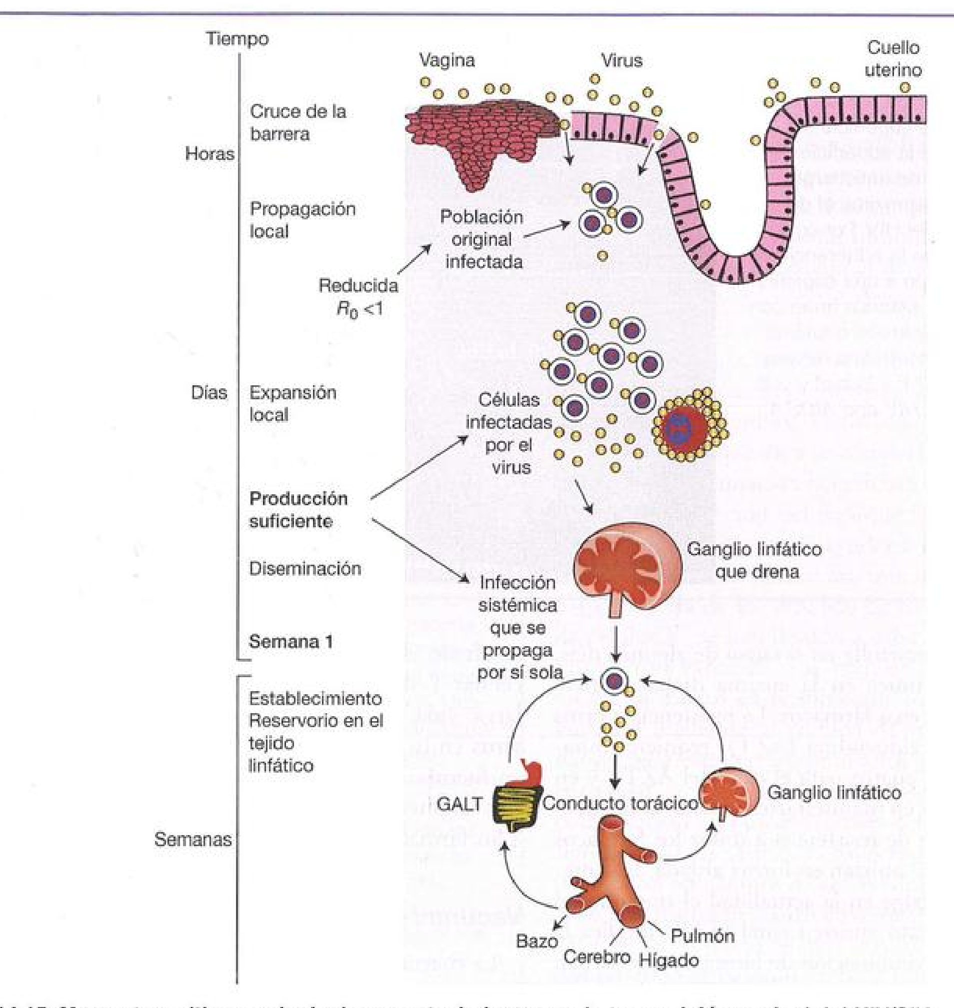


Figura 14.15. Momentos, sitios y principales acontecimientos en la transmisión vaginal del HIV/SIV.

El modelo animal macaco rhesus SIV provee una ventana a través de la cual se puede ver la infección temprana. En el transcurso de horas, el virus presente en el inóculo puede ingresar por alteraciones de la barrera epitelial de las mucosas para llegar a las células diana susceptibles. La pequeña población original focal infectada en un inicio está compuesta, sobre todo, por células T en reposo. La población original se expande en forma local en estas células T CD4 "en reposo" y activadas. La expansión local es necesaria para diseminar la infección hasta el ganglio linfático que drena, y con posterioridad a través del torrente sanguíneo, para establecer una infección que se propaga por sí sola a los órganos linfoides secundarios. Al atravesar la barrera, las pequeñas poblaciones originales (con el riesgo asociado de que la tasa reproductiva básica, R_0, disminuya a menos de uno) y la expansión local son momentos de vulnerabilidad para el virus en la primera semana de la infección. Estos sitios de vulnerabilidad crean oportunidades para prevenir la infección. Los microbicidas y las vacunas que podrían reducir el tamaño de la población inicial de células infectadas podrían abortar la infección en el punto de entrada o prevenir la siembra viral eficaz en sitios distantes requerida para el establecimiento de una infección sistémica. En los seres humanos, la infección por HIV-1 se manifiesta clínicamente por primera vez en el transcurso de semanas y, por lo tanto, es necesario el modelo animal para observar la transmisión sexual de las mucosas y los estadios tempranos de la infección. (Gentilmente proporcionada por Ashley Haase; de Haase A.T. (2010) *Nature* **464**, 217-223.)

rretrovirales son los inhibidores nucleósido/nucleótido de la transcripción inversa. Estos análogos de nucleósido/nucleótido se incorporan a la cadena en crecimiento del DNA viral que conduce a la terminación y la producción de virus no infeccioso. La transcripción inversa también puede ser inhibida por la segunda clase de fármacos, los inhibidores no nucleósido/no nucleótido de la transcripción inversa, que se unen de modo alostérico en un sitio distante del sitio de unión al sustrato. Los inhibidores de la proteasa viral inhiben la escisión de las poliproteínas gag y pol. El primer inhibidor de la fusión, la enfuvirtida, fue aprobada por la *Food and Drug Administration* (FDA) de los Estados Unidos en 2003, y es un péptido que se une a la gp41 para inhibir la fusión. El primer inhibidor de la integrasa fue aprobado en los Estados Unidos en 2007.

Un problema fundamental del tratamiento contra el HIV es el desarrollo de la resistencia a los fármacos. La naturaleza proclive al error de la transcripción inversa, la gran carga viral y la tasa de replicación rápida del virus en muchos individuos infectados significa que albergan típicamente un número elevado de variantes de HIV. La administración de fármacos puede seleccionar una variante que tenga resistencia. La resistencia a los fármacos contra muchos de los inhibidores de la proteasa y algunos de los análogos de nucleó-

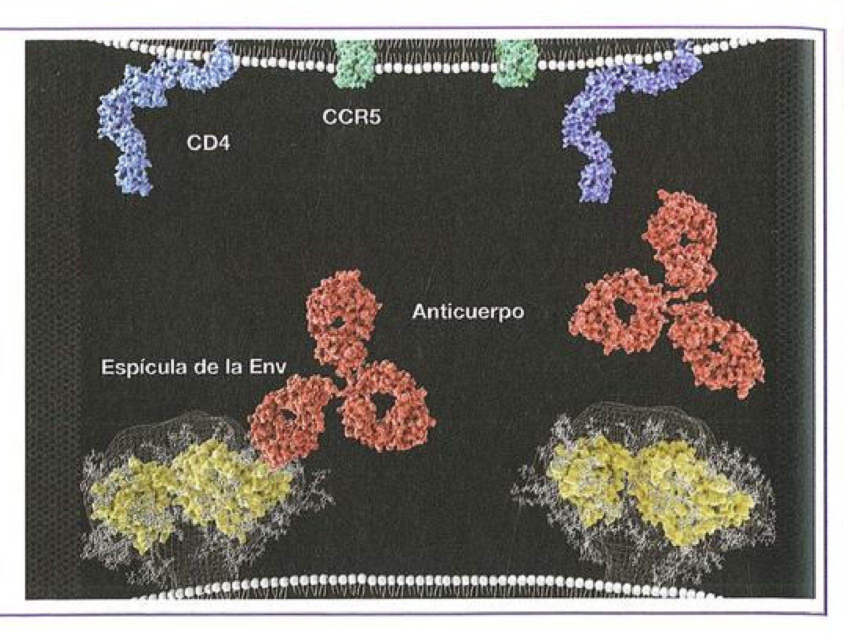


Figura 14.16. Modelo para la neutralización del HIV por anticuerpos.

La entrada viral está mediada por las espículas de la envoltura de la superficie del virus con CD4 y CCR5 de la superficie de la célula diana. La molécula de anticuerpo tiene un volumen que se aproxima al de una espícula de la envoltura del HIV. Por consiguiente, es de esperar que la adherencia de una molécula de anticuerpo a una espícula muestre una interferencia estérica firme con la adherencia del virus, su fusión o ambas. (De Poignard y cols. [2001] *Annual Review of Immunology,* **19**, 253-274; y Schief y cols. [2010] *Current Opinion in HIV and AIDS* **4**, 431-440.)

sidos más potentes se desarrolla en el curso de algunos días, ya que una mutación única en la enzima diana confiere resistencia a muchos de esos fármacos. La resistencia a otros antirretrovirales, como zidovudina (AZT), requiere mutaciones múltiples (tres o cuatro para el caso del AZT), y en consecuencia, tarda más en manifestarse. Debido al desarrollo relativamente rápido de resistencia a todos los fármacos contra el HIV cuando se utilizan en forma aislada, la supresión efectiva del HIV exige en la actualidad el tratamiento combinado. El tratamiento antirretroviral (TAR) implica la administración de una combinación de fármacos que actúan por mecanismos diferentes.

La TAR resultó muy eficaz en el manejo de los niveles virales en los individuos infectados. Durante las primeras 2 semanas de tratamiento, las cargas virales en el plasma disminuyen muy rápidamente y ello refleja la inhibición de la producción de virus por las células infectadas y la eliminación rápida de virus libre de la circulación (semivida de alrededor de 30 minutos). Los resultados indican que la semivida de las células productivamente infectadas es de cerca de 2 días. Al final de las 2 semanas, la viremia disminuye en más del 95%, lo cual significa una pérdida casi completa de células T CD4+ productivamente infectadas. A medida que son controladas la replicación y la infección por HIV, tiene lugar la elevación concomitante en el recuento de células T CD4+ de la sangre periférica. Esta elevación se atribuye a tres mecanismos: redistribución de las células CD4+ de memoria desde los tejidos linfoides a la circulación; reducción de los niveles anormales de la activación inmunitaria asociada con la disminución de la destrucción de las células T CD8+ infectadas, y aparición de células T vírgenes nuevas provenientes del timo.

Después de la depuración inicial rápida y casi completa del virus libre, la segunda fase lenta de declinación viral refleja la disminución muy lenta de la producción de virus en reservorios con vida más prolongada, como las células dendríticas y los macrófagos, provenientes de las células T CD4+ de memoria con infección latente que fueron activadas. Se postuló una tercera fase incluso más lenta como resultado de la reactivación del provirus integrado en las células T de memoria y otros reservorios de infección de larga vida. Las células dendríticas foliculares almacenan virus en la forma de complejos inmunes, que las convierte en fuentes a largo plazo del virus infeccioso. Estos reservorios latentes pueden persistir durante años y son resistentes a los fármacos contra el HIV empleados en la actualidad.

Vacunas contra el HIV-1

La mayor parte de los epidemiólogos coincide en que la manera más adecuada de controlar la pandemia de HIV-1 sería una vacuna eficaz. Lamentablemente, el desarrollo de esta vacuna enfrenta obstáculos importantes, en estrecha asociación con las características del virus, entre las que se hallan su variabilidad, la naturaleza de las espículas de la envoltura y la capacidad de aquél de integrarse en los cromosomas de las células huéspedes y transformarse en latente.

La mayoría de las vacunas antivirales parecen ser eficaces porque simulan la infección natural e inducen respuestas de anticuerpos neutralizantes. Los mastocitos de larga vida de la médula ósea secretan anticuerpos neutralizantes que se encuentran en el suero y pueden actuar en forma inmediata para inactivar las partículas virales (Figura 14.16). Por cierto, la probabilidad de que una vacuna sea eficaz a menudo se evalúa mediante la investigación de las concentraciones séricas de los anticuerpos neutralizantes. Además, el contacto con el virus estimula a las células B de memoria inducidas por la vacuna para secretar anticuerpos neutralizantes. Los estudios realizados en monos indican que los anticuerpos neutralizantes pueden proteger contra el HIV. Si estos anticuerpos se administran en dosis relativamente elevadas y luego se desafía a los monos con un virus híbrido humano (HIV)/mono (SIV), los animales no revelan signos de infección, es decir, muestran inmunidad "esterilizante". Sin embargo, se requiere que los anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacunación sean activos contra un amplio espectro de variantes diferentes del HIV (denominados anticuerpos ampliamente neutralizantes). Se sabe que estos

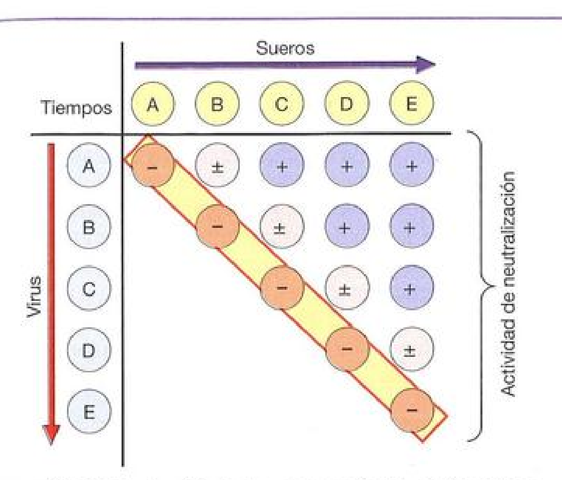


Figura 14.17. Evolución de la respuesta de anticuerpos neutralizantes en la infección por HIV.

A-E indican virus y sueros en diferentes momentos a partir de los tiempos A-E durante la evolución de la infección en un individuo. El suero tomado en el tiempo A no tiene actividad neutralizante significativa contra el virus aislado del plasma de los individuos infectados en el tiempo A. El suero tomado en B tiene actividad débil. El suero tomado en C y los tiempos posteriores claramente neutraliza el virus del tiempo A. Una vez que la concentración de anticuerpos séricos neutralizantes ha alcanzado cierto umbral tras la exposición a una variante dada predominante del virus, la presión de selección es ejercida de modo que emerge una variante resistente a una nueva neutralización a partir de la enorme dotación de variantes presentes en el individuo infectado. Se desarrolla una respuesta de anticuerpos neutralizantes contra esta variante nueva y el ciclo se repite. (Cortesía de Doug Richman; de Richman D.D. y cols. [2003] *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **100**, 4144-4149.)

anticuerpos existen pero aún no se logró el diseño de inmunógenos para inducirlos. En realidad, la infección natural por HIV induce respuestas débiles de anticuerpos ampliamente neutralizantes, lo cual destaca las dificultades para encontrar un inmunógeno adecuado. La infección natural tiende a inducir anticuerpos neutralizantes específicos de tipo (Figura 14.17). Cuando estos anticuerpos alcanzan un umbral crítico, surge un virus resistente. Con el tiempo, se desarrolla la respuesta de anticuerpos neutralizantes contra este virus y emerge un virus resistente nuevo, y así sucesivamente. Al parecer, el virus siempre está un paso por delante de la respuesta de anticuerpos neutralizantes.

Por las razones expuestas antes, parece ser dificultoso diseñar una vacuna contra el HIV que proporcione inmunidad esterilizante a través de la inducción de anticuerpos ampliamente neutralizantes. En efecto, no se cree que la mayor parte de las vacunas actuales disponibles contra otros virus brinde inmunidad esterilizante. En cambio, inducen títulos séricos de anticuerpos neutralizantes para atenuar la infección, la que luego es limitada por la inmunidad celular o innata y se evitan los síntomas manifiestos. En otras palabras, la vacunación protege contra la enfermedad en lugar de hacerlo contra la infección.

Los estudios en modelos animales revelaron que la protección contra la enfermedad para ciertos virus puede lograrse mediante la inducción de una respuesta inmunitaria celular a través de la vacunación. En ausencia de métodos eficaces para inducir anticuerpos ampliamente neutralizantes, muchas de las investigaciones de las vacunas contra el HIV están dirigidas a las respuestas inmunitarias celulares. Los fundamentos principales fueron que, si en los vacunados pueden inducirse respuestas inmunitarias potentes de células T, esta respuesta reducirá el daño de las células T CD4+ tras la infección primaria y disminuirá la viremia estable. Como la viremia estable se correlacionó con el tiempo de progresión al sida, esto podría proporcionar un beneficio directo a los vacunados. Además, la reducción de la carga viral en los individuos vacunados disminuye las tasas de transmisión ya que ésta se correlaciona con la viremia. De tal modo, la vacunación beneficiará a toda la población. Por último, la reducción del daño de las células T CD4+ en la infección primaria puede ayudar a mantener la inmunidad contra muchos patógenos durante un período prolongado.

La mayoría de los estudios de las denominadas "vacunas de células T" se han llevado a cabo en monos y los resultados fueron variables. Las mejores respuestas de células T CD8+, al menos en términos de mediciones ELISPOT, se lograron mediante el empleo de vectores virales recombinantes para expresar los productos génicos de HIV/SIV. En particular, la vacunación con vectores adenovirus, solos o en combinación con otros vectores o DNA, indujo respuestas significativas de células T. Estas respuestas brindaron cierta protección en algunos modelos simianos pero no en otros.

Se han realizado cuatro ensayos clínicos de vacuna contra HIV en ser humano en mayor escala. Dos ensayos informados en 2003 se basaron en la gp120 monomérica recombinante y podrían describirse como "vacunas anticuerpos", ya que se esperaba obtener principalmente respuestas de anticuerpos. Sin embargo, las respuestas no neutralizan las cepas de HIV típicas y las vacunas no demostraron ninguna eficacia. Un ensayo clínico informado en 2007 se basó en un vector de adenovirus que codifica proteínas internas gag, pol y nef del HIV y fue descrito como una "vacuna de células T". La vacuna no mostró eficacia.

Inicialmente, se consideró que la vacuna había mejorado las tasas de infección, pero estudios exhaustivos cuestionaron esta interpretación. El ensayo clínico más reciente informado en 2009 se basó en un vector pox de canarios que codifica gag, pro y env del HIV con el estímulo de env (gp120 recombinante). Esto se describió como una "vacuna de anticuerpos y células T". El ensayo describió la posible eficacia modesta cerca a los límites de la significación estadística que parecía tener muy corta duración. Intensos esfuerzos están en curso para ver si se puede identificarse alguna correlación con la protección en este ensayo.

En general, está claro que el desarrollo de una vacuna contra HIV es uno de los retos mayores que enfrenta la medicina moderna. Muchos consideran que el éxito requerirá el desarrollo de inmunógenos que puedan inducir ambas respuestas inmunitarias, de anticuerpos ampliamente neutralizantes y celular.

RESUMEN

Enfermedades por inmunodeficiencia primaria

- Las inmunodeficiencias primarias son mucho menos comunes que las secundarias, se producen como consecuencia de un defecto génico y pueden afectar casi cualquier componente de la respuesta inmunitaria.
- Se caracterizan por las infecciones oportunistas.
- Varias mutaciones ligadas al cromosoma X producen inmunodeficiencia primaria en los varones.
- Las inmunodeficiencias primarias esclarecen la importancia de los componentes individuales del sistema inmunitario para combatir agentes infecciosos determinados.
- El tratamiento comprende antibióticos profilácticos, inmunoglobulina intravenosa, trasplante de médula ósea y, tal vez, terapia génica.

Las inmunodeficiencias primarias afectan las respuestas innatas

- Las mutaciones en los genes que codifican los receptores de reconocimiento de patrones o sus moléculas adaptadoras o de señalización asociadas afectarán particularmente las respuestas innatas.
- Los defectos en las células fagocíticas o del complemento causan sobre todo infecciones por bacterias que normalmente podrían eliminarse por opsonización y fagocitosis.
- Cuando hay incapacidad de producir el complejo de ataque a la membrana, hay sólo un espectro muy limitado de propensión a infecciones, sobre todo con especies de *Neisseria*.
- Los defectos de los componentes de complemento se asocian con la degeneración macular relacionada con la edad o con lupus eritematoso sistémico.
- Una mutación en cualquiera de los varios genes implicados en la respuesta de IFNγ conduce a un aumento de la susceptibilidad a las infecciones micobacterianas.
- Las mutaciones que influyen en las vías del TNF pueden conducir a situaciones en las que la inflamación aparece en ausencia de un estímulo.

Inmunodeficiencias primarias de células B

- La deficiencia selectiva de IgA es la inmunodeficiencia primaria más común, si bien a menudo los individuos afectados son asintomáticos.
- En la agammaglobulinemia ligada al X, todas las clases de anticuerpos están ausentes o sólo presentes en concentraciones extremadamente bajas debido a un defecto en la tirosina cinasa de Bruton, que produce la detención de la maduración en el estadio de célula pre-B.
- La inmunodeficiencia común variable se asocia con concentraciones bajas de IgG e IgA, con IgM o sin ella.

Inmunodeficiencias primarias de células T

- Los pacientes con deficiencias de células T son susceptibles a las bacterias, virus y hongos intracelulares.
- La falta de células T funcionales deterioran las respuestas de células B.
- En el síndrome de DiGeorge completo, la ausencia de timo conduce a una incapacidad de producir células T, aunque en la mayoría de los casos hay sólo un defecto parcial.
- Las mutaciones que afectan la enzima purina nucleósido fosforilasa conducen a la acumulación de metabolitos tóxicos que afectan sobre todo las células T.
- Los genes relacionados con el síndrome de Omenn son similares a los que determinan la IDCG, pero el sitio de la mutación real es diferente y no tiene un efecto tan intenso.
- La ausencia de moléculas de clase I o clase II del CMH dará por resultado la incapacidad de las células T a sufrir selección positiva en el timo.
- Varios defectos génicos, como aquellos asociados con el síndrome de Wiskott-Aldrich y con el síndrome de hiper-IgM, afectan de modo adverso la capacidad de las células T de interactuar con los linfocitos B.
- Las mutaciones en los genes necesarios para la actividad de las células T reguladoras producen enfermedades autoinmunitarias.

Inmunodeficiencia combinada grave

- Las mutaciones nulas en varios genes diferentes, como *γC, ADA, RAG-1, RAG-2, JAK-3, Artemis* y cadena α de *IL-7R*, pueden dar por resultado una IDCG.
- Hay un bloqueo complete en el desarrollo de células T y, por lo tanto, la falta completa de ayuda para la célula B. Según el defecto génico particular, también pueden estar las células B, las células NK o ambas.
- En la mayoría de los casos de terapia génica para las inmunodeficiencias primarias, se ha intentado insertar un gen normal para ADA o γC.

Inmunodeficiencia secundaria

- La inmunodeficiencia puede ser secundaria a desnutrición, trastornos linfoproliferativos, agentes como rayos X y fármacos citotóxicos e infecciones virales.

Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida)

- El sida es el resultado de la infección por los lentivirus HIV-1 o HIV-2; el HIV-1 es mucho más prevalente en todo el mundo.
- El HIV-1 infecta las células CD4+, como células T CD4+, macrófagos y células dendríticas.
- La depleción de células T CD4+, muy intensa en la infección primaria y en particular en el intestino y luego más lenta en un período de años durante la latencia clínica, conduce al daño del sistema inmunitario, que convierte a un individuo en susceptible a patógenos oportunistas (sida).
- El HIV-1 es un retrovirus, que ingresa en las células por interacción de las espículas de la envoltura con CD4 y receptores de quimiocina, CCR5 o CXCR4. El genoma de RNA se transcribe de modo inverso y el cDNA viral resultante se integra en los cromosomas de las células T huéspedes.
- El DNA proviral integrado puede permanecer latente en las células durante períodos muy largos, lo cual plantea serios problemas para la eliminación total del virus y, por consiguiente, dificulta una curación completa de la infección por HIV-1.
- El DNA proviral puede ser transcrito para generar partículas virales nuevas con la ayuda de diversas proteínas accesorias virales, que favorecen la replicación del virus o adaptan la maquinaria de las células T huéspedes a su producción.
- Una característica distintiva importante del HIV es la enorme diversidad del virus, presente incluso en un solo individuo infectado, debido a errores inherentes implicados en la transcripción a partir de un genoma de RNA, el

recambio rápido y la carga viral elevada típica que porta el individuo.

- La diversidad viral y la latencia constituyen los principales obstáculos para la farmacoterapia, a pesar de que los agentes desarrollados fueron sumamente eficaces y los regímenes basados en la combinación de fármacos pudieron mantener al virus controlado durante muchos años, si no indefinidamente.
- El diseño de vacunas también tuvo que enfrentar la diversidad viral, y si bien hay indicios promisorios y se realizan grandes esfuerzos, aún no se han diseñado inmunógenos que induzcan cantidades adecuadas de anticuerpos neutralizantes o respuestas de células T con la potencia suficiente para proteger de manera significativa de la exposición a con una amplia diversidad de HIV.

LECTURAS ADICIONALES

Arhel N. & Kirchhoff F. (2010) Host proteins involved in HIV infection: new therapeutic targets. Biochimica et Biophysica Acta 1802, 313–321.

Austen K.F., Burakoff S.J., Rosen F.S. & Strom T.B. (eds) (2001) Therapeutic Immunology, 2nd edn. Blackwell Science, Oxford.

Bonilla F.A. & Geha R.S. (2006) Update on primary immunodeficiency diseases. Journal of Allergy and Clinical Immunology 117 (2 suppl), S435–441.

Broder S. (2010) The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. Antiviral Research 85, 1–18.

Buckley R.H. (2002) Primary immunodeficiency diseases: dissectors of the immune system. Immunological Reviews 185, 206–219.

Conley M.E. et al. (2009) Primary B cell immunodeficiencies: comparisons and contrasts. Annual Review of Immunology 27, 199–227.

Greene W.C. & Peterlin B.M. (2002) Charting HIV's remarkable voyage through the cell: basic science as a passport to future therapy. Nature Medicine 8, 673–680.

Haase A.T. (2010) Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. Nature 464, 217–223.

Klasse P.J., Shattock R. & Moore J.P. (2008) Antiretroviral drug-based microbicides to prevent HIV-1 sexual transmission. Annual Review of Medicine 59, 455–471.

Kohn D.B. (2010) Update on gene therapy for immunodeficiencies. Clinical Immunology 135, 247–254.

Malim M.H. & Emerman M. (2008) HIV-1 accessory proteins—ensuring viral survival in a hostile environment. Cell Host & Microbe 3, 388–398.

McMichael A.J., Borrow P., Tomaras G.D., Goonetilleke N. & Haynes B.F. (2010) The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. Nature Reviews Immunology 10, 11–23.

Notarangelo L.D. et al. (2009) Primary immunodeficiencies: 2009 update. International Union of Immunological Societies Expert Committee on Primary Immunodeficiencies, Journal of Allergy and Clinical Immunology 124, 1161–1178.

Ochs H.D., Smith C.I.E. & Puck J.M. (eds.) (2007) Primary Immunodeficiency Diseases—A Molecular and Genetic Approach. 2nd edn. Oxford University Press, Oxford.

Richman D.D., Margolis D.M., Delaney M., Greene W.C., Hazuda D. & Pomerantz R.J. (2009) The challenge of finding a cure for HIV infection. Science 323, 1304–1307.

Sharp P.M. & Hahn B.H. (2008) AIDS: prehistory of HIV-1. Nature 455, 605–606.

Simonte S.J. & Cunningham-Rundles C. (2003) Update on primary immunodeficiency: defects of lymphocytes. Clinical Immunology 109, 109–118.

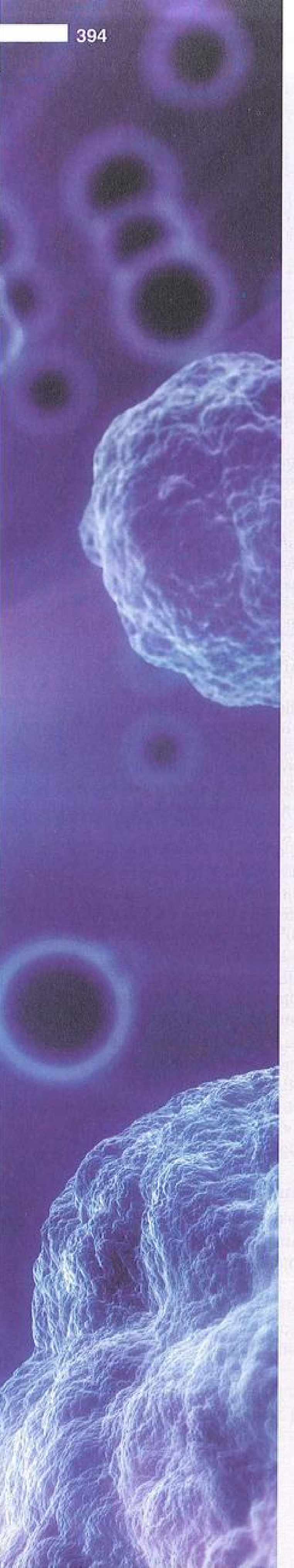
Tilton J.C. & Doms R.W. (2010) Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. Antiviral Research 85, 91–100.

Turvey S.E., Bonilla F.A. & Junker A.K. (2009) Primary immunodeficiency diseases: a practical guide for clinicians. Postgraduate Medical Journal 85, 660–666.

van de Vosse E., van Dissel J.T. & Ottenhoff T.H. (2009) Genetic deficiencies of innate immune signalling in human infectious disease. The Lancet Infectious Diseases 9, 688–698.

Virgin H.W. & Walker B.D. (2010) Immunology and the elusive AIDS vaccine. Nature 464, 224–231.

Walker L.M. & Burton D.R. (2010) Rational antibody-based HIV-1 vaccine design: current approaches and future directions. Current Opinion in Immunology 22, 358–366.



CAPÍTULO 15

Alergia y otras hipersensibilidades

Conceptos clave

A modo de resumen...

Las infecciones inducen respuestas inmunitarias adecuadas que detectan antígenos extraños. En el caso de las respuestas adaptativas, es necesario que se produzca la proliferación clonal de linfocitos para generar un número suficiente de células específicas para el antígeno. Se producen anticuerpos de una clase apropiada para eliminar la infección y se unen a la superficie del patógeno. La formación de inmunocomplejos que contienen IgM o IgG desencadena la activación de la vía clásica del complemento. La IgG y los componentes del complemento opsonizan los microorganismos para la fagocitosis ulterior. En el caso de las infecciones parasitarias, la IL-4 y la IL-13 derivadas de Th2 estimulan la producción de IgE por las células B. En el caso de los patógenos intracelulares participan las células NK, las células T citotóxicas y las células Th1, que producen factores que activan los macrófagos como el IFNγ.

Introducción

En la **alergia**, la respuesta inmunitaria se extiende más allá de sus límites habituales de reconocer sólo patógenos extraños, para abarcar también los que deberían ser antígenos ambientales inocuos. Esta es una forma de **hipersensibilidad**, inmunidad exaltada que también puede adoptar la forma de reactividad contra antígenos provenientes de las mismas o de diferentes especies. Estas respuestas provocan daño tisular, **inmunopatología**, si el antígeno está presente en cantidades relativamente grandes o si la respuesta inmunitaria adquirida está en un nivel mayor. Cabe destacar que los mecanismos subyacentes a las reacciones de hipersensibilidad son los mismos que los empleados normalmente por el organismo en la lucha contra la infección. Los diferentes estados de hipersensibilidad originalmente fueron clasificados por Gell y Coombs como tipos I-IV, y esta clasificación sigue siendo extremadamente útil. Sin embargo, a menudo sucede que en un estado de enfermedad en particular coexiste más de uno de estos tipos.

Avances y descubrimientos 15.1—El descubrimiento de la anafilaxia

Desde tiempo inmemorial, se reconocieron en algunos individuos reacciones de hipersensibilidad contra agentes ambientales normalmente inocuos. El interés científico en estas reacciones se suscitó por las observaciones de Charles Richet y Paul Portier. Durante un crucero por los Mares del Sur en el yate del Príncipe Alberto de Mónaco, éste, presumiblemente "picado" por el contacto con *Physalia* (medusa conocida como Fragata Portuguesa, con tentáculos muy desagradables), sugirieron que la producción de toxina por ese celenterado podría ser de interés. Permitamos que Richet y Portier cuenten la historia con sus propias palabras (1902).

"A bordo del yate del Príncipe se llevaron a cabo experimentos que demostraron que un extracto acuoso de glicerina de los filamentos de *Physalia* era sumamente tóxico para patos y conejos. De regreso a Francia, no pude obtener *Physalia* y decidí estudiar de manera comparativa los tentáculos de *Actinaria* (anémona de mar). Mientras tratábamos de determinar la dosis tóxica de los extractos, pronto descubrimos que deben pasar algunos días antes de evaluar la respuesta; en el caso de varios perros, la muerte se produjo cuatro o cinco días después de la administración o incluso posteriormente. Conservamos aquellos canes en los que la dosis había resultado insuficiente para causarles la muerte con el objeto de llevar a cabo una segunda investigación cuando se hubieran recuperado. En este momento sucedió un hecho imprevisto. Los perros que se habían recuperado eran intensamente sensibles y murieron unos minutos después de la administración de dosis pequeñas. El experimento más típico, cuyos resultados fueron indiscutibles, se llevó a cabo en un animal particularmente sano. Al principio se le administró 0,1 mL de extracto de glicerina y no se enfermó: 22 días después, cuando se encontraba en perfecto estado de salud, le administré una segunda inyección de la misma cantidad. En unos pocos segundos, el perro se presentó muy enfermo; la respiración se tornó dificultosa; sólo podía arrastrarse por una distancia corta, yacía sobre un costado, comenzó con diarrea y vómitos sanguinolentos y murió en 25 minutos".

El desarrollo de la sensibilidad a sustancias relativamente inocuas fue denominado por estos autores **anafilaxia**, en contraste con la **profilaxis**.

Hipersensibilidad anafiláctica (tipo I)

El fenómeno de la anafilaxia

Las primeras consideraciones de respuestas inapropiadas contra antígenos extraños se relacionan con la **anafilaxia** (Avances y descubrimientos 15.1). El fenómeno puede reproducirse fácilmente en cobayos que, como los seres humanos, constituyen una especie altamente susceptible. Una sola inyección de 1 mg de un antígeno como la albúmina de huevo no tiene un efecto evidente en el cobayo. Si la inoculación se repite a las 2-3 semanas, el animal sensibilizado reacciona de manera muy intensa con síntomas de anafilaxia generalizada; casi de inmediato comienza con respiración sibilante y en el término de minutos muere por asfixia. El examen muestra constricción pronunciada de los bronquíolos y los bronquios, y por lo general se observa contracción del músculo liso y dilatación capilar. Reacciones similares se producen en los seres humanos muy alérgicos contra picaduras de insectos, pólenes, alimentos, fármacos como la penicilina u otros agentes capaces de precipitar respuestas anafilácticas potencialmente mortales. En muchos casos, sólo una inyección oportuna de adrenalina, que rápidamente revierte la acción de la histamina sobre la contracción del músculo liso y la dilatación capilar, puede evitar la muerte. A los individuos con riesgo conocido se les brindan jeringas precargadas con adrenalina para la autoadministración.

Sir Henry Dale reconoció que la histamina imita los cambios sistémicos de la anafilaxia y que la exposición del útero de un cobayo sensibilizado al antígeno induce una contracción inmediata asociada con una desgranulación explosiva de los mastocitos (Figura 1.20) que determina la liberación de histamina y otros mediadores (Figura 1.21).

La anafilaxia se desencadena por la acumulación de receptores de IgE en los mastocitos a través de entrecruzamientos

En los roedores se han reconocido dos tipos principales de **mastocitos**: los que se hallan en la mucosa intestinal y los que se localizan en el peritoneo y otros tejidos conectivos. Difieren en varios aspectos, por ejemplo en el tipo de proteasa y proteoglucano en sus gránulos y en su capacidad de proliferar y diferenciarse en respuesta a la estimulación por la interleucina 3 (IL-3) (Cuadro 15.1). Los dos tipos tienen precursores comunes y son interconvertibles, según las condiciones del medio, con el fenotipo de las mucosas MC_t (triptasa) favorecido por la IL-3 y el MC_{tc} del tejido conectivo (triptasa y quimasa) estimulado por los niveles relativamente elevados del factor de células madre (ligando c-kit). En los seres humanos, casi todos los mastocitos de la mucosa intestinal y los alvéolos pulmonares son sólo triptasa positivos, mientras que los de la piel, la submucosa intestinal y otros tejidos conectivos son triptasa, quimasa y carboxipeptidasa positivos. Los mastocitos de una tercera población, menos frecuente, son exclusivamente quimasa positivos y se encuentra en la mucosa nasal y la submucosa intestinal.

Los mastocitos y sus equivalentes en la circulación (los basófilos) despliegan en forma abundante el receptor FcεRI de alta afinidad para IgE (K_a 10^{10} M^{-1}) (véase el Cuadro 3.2). El receptor también se expresa, aunque en niveles considerablemente menores, sobre las células de Langerhans, las células dendríticas, los monocitos, los macrófagos, los neutrófilos, los eosinófilos, las plaquetas y el epitelio intestinal. Sobre los basófilos y los mastocitos, el receptor es un tetrámero que consta de una cadena α, una cadena tetraspanina β y dos cadenas γ unidas por enlaces (puentes) disulfuro, mientras que sobre otros tipos celulares, en los que el recep-

Cuadro 15.1. Comparación de dos tipos principales de mastocitos.

Características	Mastocitos de las mucosas	Mastocitos del tejido conectivo
General		
Abreviatura*	Mc_t	Mc_{tc}
Distribución	Intestino y pulmón	La mayoría de los tejidos **
Diferenciación favorecida por	IL-3	Factor de fibroblastos
Dependencia de célula T	+	–
Receptor Fcε de alta afinidad	2×10^5/célula	3×10^4/célula
Gránulos		
Coloración con azul Alcian y safranina	Azul y castaño	Azul
Ultraestructura	Rollos	Rejillas/enrejados
Proteasa	Triptasa	Triptasa y quimasa
Proteoglucano	Sulfato de condroitina	Heparina
Desgranulación		
Liberación de histamina	+	++
LTC_4: liberación de PGD_2	25:1	1:40
Bloqueada por el cromoglicato disódico/teofilina	–	+

*Basado en la presencia de proteasa en los gránulos.
** Predomina en la piel y en la submucosa intestinal normales.

tor está implicado en la presentación del antígeno en lugar de activar la desgranulación, la cadena β está ausente y, en consecuencia, el receptor es un trímero. La cadena α tiene dos dominios externos de tipo Ig que determinan la unión a la región Cε3 de la IgE (Figura 15.1), mientras que cada una de las cadenas γ y la cadena β contiene un motivo de activación de inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) para la señalización celular. En ausencia de IgE unida, el nivel de FcεRI disminuye sustancialmente. En cambio, si está presente se produce la sobreexpresión del receptor sobre los mastocitos, y como la cadena γ es compartida con el mastocito FcγRIIIA, tiene lugar la consecuente inhibición competitiva del receptor Fc para la IgG. La anafilaxia es mediada por la reacción del alérgeno con anticuerpos IgE sobre la superficie del mastocito, y el entrecruzamiento de estos anticuerpos activa la liberación del mediador (Figura 15.2). El fenómeno crítico es la agregación de los receptores mediante entrecruzamientos, como lo demuestra con claridad la capacidad de los anticuerpos divalentes que reaccionan directamente con el receptor para activar al mastocito.

La agregación de las cadenas α del FcεRI activa las proteínas tirosincinasas Lyn y Fyn asociadas con las cadenas β y si los agregados persisten, esto conduce a la transfosforilación de las cadenas β y γ de otros receptores FcεRI dentro del cúmulo y al reclutamiento de la Syk cinasa (Figura 15.3). La serie posterior de pasos de activación inducidos por fosforilación lleva al final a la desgranulación del mastocito con la liberación de mediadores preformados y la síntesis de metabolitos del ácido araquidónico producidos por las vías de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa (véase la Figura 1.21). Para recapitular, los mediadores preformados que se liberan de los gránulos son histamina, heparina, triptasa, quimasa, carboxipeptidasa, factores quimiotácticos de eosinófilos, neutrófilos y monocitos, factor activador de plaquetas y serotonina. Por el contrario, los leucotrienos LTB_4, LTC_4 y LTD_4, la prostaglandina PGD_2 y los tromboxanos son sintetizados *de novo*. También se liberan citocinas de tipo Th2 IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, así como IL-1, IL-3, IL-8, IL-11, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), TNF (factor de necrosis tumoral), CCL2 (proteína quimiotáctica de monocitos-1, MCP-1), CCL5 (RANTES) y CCL 11 (eotaxina). En circunstancias normales, estos mediadores contribuyen a orquestar el desarrollo de una reacción inflamatoria aguda defensiva (y en este contexto, es menester recordar que las fracciones del complemento C3a y C5a también pueden activar a los mastocitos a través de los receptores para el complemento). Cuando hay una liberación masiva de estos mediadores en condiciones anormales, como en la enfermedad atópica, predominan sus efectos broncoconstrictores y vasodilatadores y se convierten en una amenaza característica.

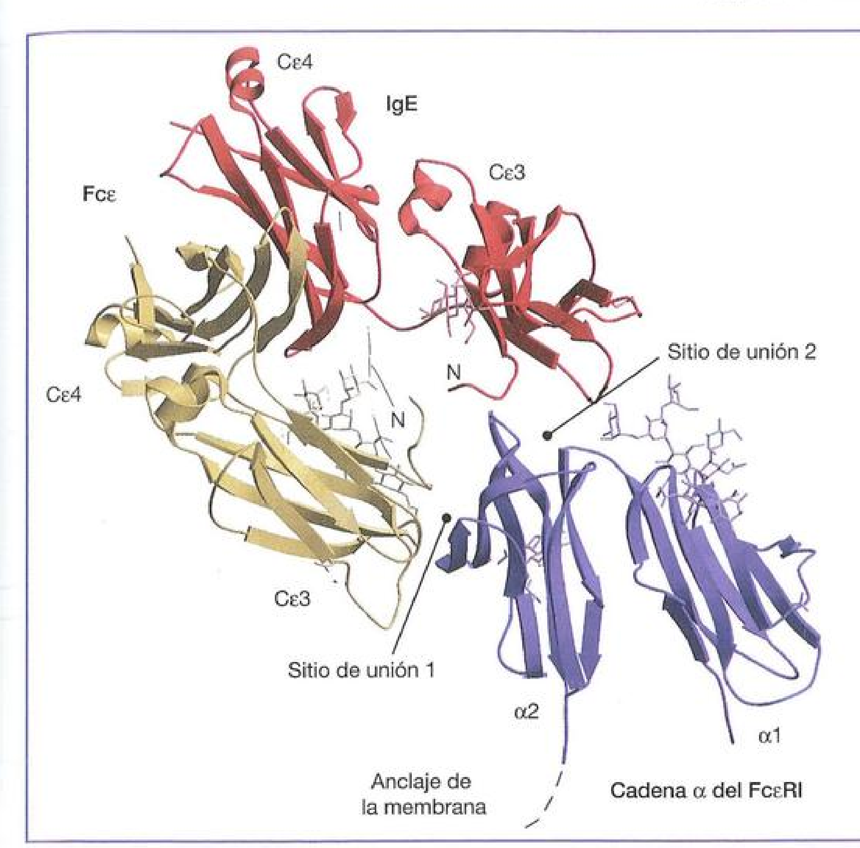


Figura 15.1. Base estructural de la unión de la IgE al receptor del mastocito de alta afinidad FcεRI.

Imagen lateral del complejo con las dos cadenas Fc (en amarillo y rojo) y la cadena α del FcεRI (en azul); los residuos del hidrato de carbono se representan como varillas. Los dos dominios Cε3 del dímero de la cadena pesada de la IgE se unen de manera asimétrica a dos sitios de interacción distintos en la cadena α del receptor. El asa β en un Cε3 se une junto a un dominio α2, mientras que las asas de superficie más la región de unión Cε2-Cε3 en el otro Cε3 interactúan con la cima de la interfase α1-α2. La estequiometría 1:1 de esta unión asimétrica impide la unión de una IgE a dos moléculas del receptor y asegura que la activación debida a la agregación α-α sólo se produzca a través de uniones multivalentes a la IgE de superficie (véase la Figura 15.2). (Fotografía gentilmente proporcionada por el Dr. Ted Jardetzky y reproducida con autorización del Nature Publishing Group.)

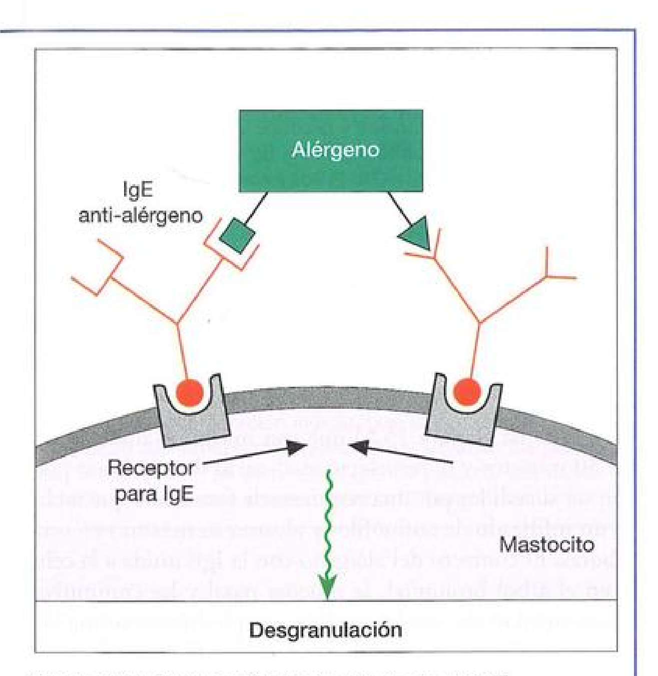


Figura 15.2. Agrupación de receptores para IgE.

El entrecruzamiento de FcεRI mediante la unión del alérgeno multivalente con la IgE que sensibiliza al mastocito conduce a su desgranulación. Obsérvese que los dos anticuerpos están dirigidos contra diferentes epítopos del mismo alérgeno y, por consiguiente, es necesario que esté representado sobre la superficie del mastocito en una frecuencia razonablemente elevada con el objeto de que se produzca un entrecruzamiento eficaz.

Alergia atópica

Progresión de la alergia

La **alergia a los alimentos, el eccema** (dermatitis atópica), la rinoconjuntivitis alérgica estacional o **fiebre del heno**, y el **asma** a menudo se producen en el mismo individuo. En realidad, en muchas personas las alergias de desarrollan en una secuencia ordenada que se ha denominado como "progresión de la alergia" (Figura 15.4). Así, las alergias gastrointestinales y cutáneas se manifiestan temprano en la vida y pueden ser seguidas más tarde por asma y fiebre del heno.

Respuestas clínicas contra alérgenos extrínsecos

Se afirmó que en los países occidentalizados hasta el 30% de los adultos y el 45% de los niños sufre, en un grado mayor o menor, de alergias que involucran reacciones anafilácticas mediadas por IgE localizadas contra alérgenos como pólenes, caspa de animales, heces de ácaros en el polvo doméstico (Figura 15.5), etc. Aun cuando se las sobreestima, es evidente que las alergias afectan a un número elevado de personas y que están en aumento. Una cantidad grande de alérgenos ha sido ahora clonada y expresada (Cuadro 15.2), y varios resultaron ser enzimas. Por ejemplo, Der p 1 es un cisteína proteasa que aumenta la permeabilidad de la mucosa bronquial y facilita de tal modo su propio pasaje junto con el de otros alérgenos por el epitelio y permite el acceso a las células del sistema inmunitario y su sensibilización. El receptor CD23 de baja afinidad para la IgE (FcεRII) sobre las

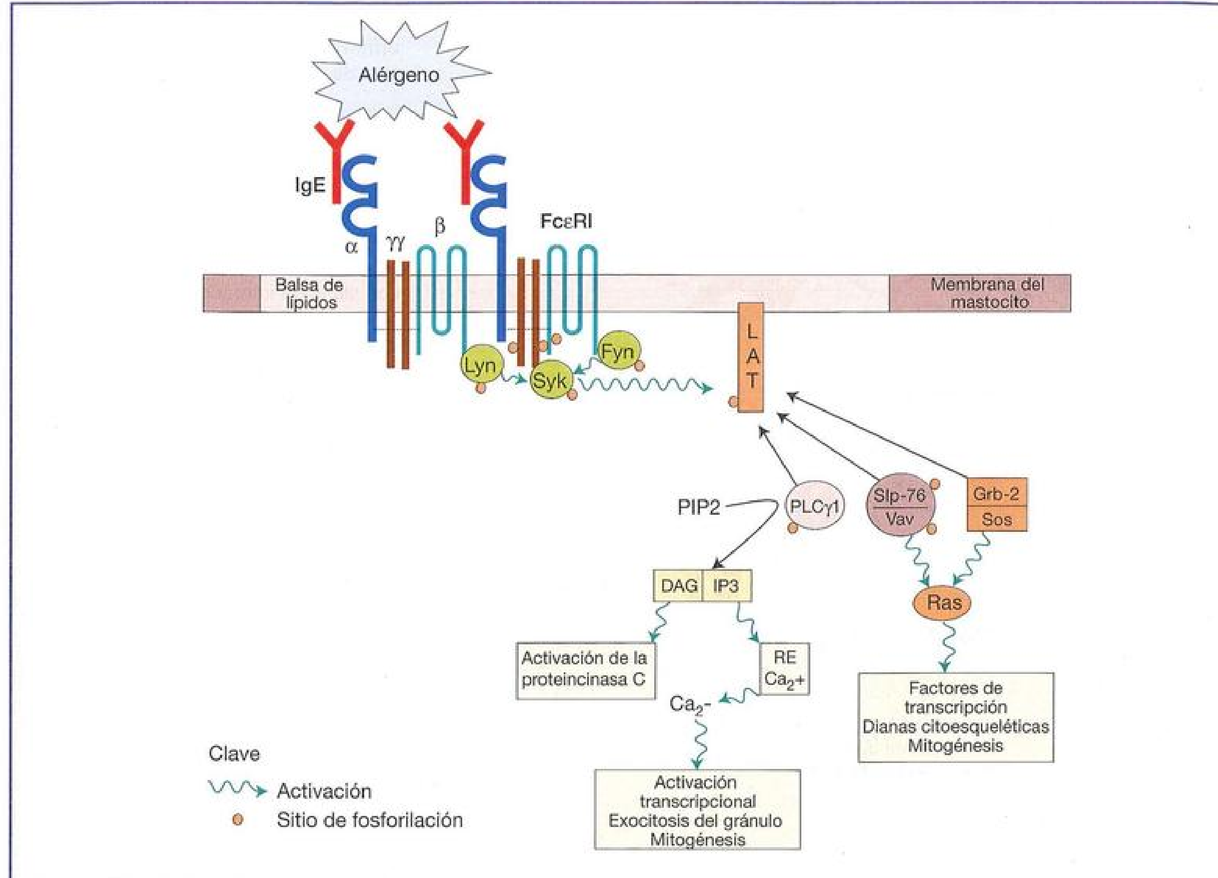


Figura 15.3. Activación del mastocito.

Esquema simplificado de algunos procesos en la señalización a través del receptor de alta afinidad de IgE, FcεRI. La agregación de las cadenas α del FcεRI en las balsas de lípidos a través de entrecruzamientos de la IgE unida por el antígeno multivalente (alérgeno) lleva a que las ITAM de las cadenas β y γ del receptor interactúen con las proteínas tirosincinasas Lyn, Syk y Fyn unidas. La fosforilación de Syk lleva a su activación y ésta a su vez fosforila y activa a la proteínas adaptadoras de membrana LAT1 y LAT2 (NTAL) que reclutan la fosfolipasa Cγ1 (PLCγ) y las moléculas adaptadoras que intervienen en la activación de las cascadas GTPasa/cinasa. La activación de PLCγ genera diacilglicerol (DAG), que tiene como diana a la proteincinasa C, mientras que el inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3) eleva el Ca^{2+} citoplasmático por depleción de los depósitos del RE. La concentración elevada de calcio activa los factores transcripcionales y produce la exocitosis de los gránulos. Los complejos Grb-2/Sos y Slp-76/Vav se asocian con el adaptador LAT1, y Grb-2/Sos lo hace además con LAT2, y activan las cascadas de cinasas en serie Ras inducidas por GTPasa; ello determina la activación de factores de transcripción y reordenamientos del citoesqueleto de actina. (Figura diseñada por Helen Turner sobre la base del artículo de Turner H. y Kinet J. P. [1999] *Nature* (Suplemento en Allergy and Asthma) **402**, B24.)

células B regula negativamente la síntesis de IgE mediante entrecruzamientos con el antígeno de la IgE unida. Sin embargo, Der p 1 causa la escisión proteolítica de CD23 y reduce así su impacto negativo en la síntesis de IgE. También escinde a CD25 (la cadena α del receptor para IL-2) sobre las células T, con lo cual limita la activación de las células Th1, y desvía la respuesta inmunitaria a la producción de IgE dependiente de Th2. La purificación de alérgenos puede abreviarse mediante el examen de las genotecas de expresión del cDNA con IgE. Este método resultó muy conveniente para purificar el alérgeno del veneno de la hormiga saltarina australiana, *Myrnecia pilosula*; imagínese el lector lo que habrá sido acumular kilos de hormigas para aislar el alérgeno usando los métodos de fraccionamiento proteico convencionales.

La reacción anafiláctica local a la inyección de antígeno en la piel de pacientes atópicos se manifiesta como una roncha y un eritema (Figura 15.6) que son máximos alrededor de los 30 minutos y se resuelven en el curso de una hora; pueden ser sucedidos por una respuesta de fase tardía que incluye un infiltrado de eosinófilos y alcanza su máximo en unas 5 horas. El contacto del alérgeno con la IgE unida a la célula en el árbol bronquial, la mucosa nasal y las conjuntivas libera mediadores de la anafilaxia y produce síntomas de **asma** o **rinitis** y **conjuntivitis alérgicas** (fiebre del heno), según el caso. Cierta proporción de los pacientes que experimenta las respuestas de fase tardía después de la exposición bronquial con el alérgeno desarrolla en el futuro **asma crónica**. Esta enfermedad afecta a unos 300 millones de personas en todo el mundo y su tratamiento representa un costo mayor de seis mil millones de dólares por año sólo en los Estados Unidos. En realidad, según la Organización Mundial de la Salud, se estima que los costos económicos asociados con el asma exceden a los de la tuberculosis y el

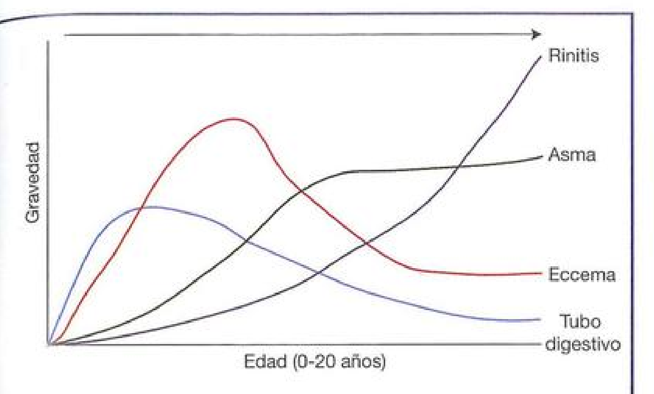


Figura 15.4. Progresión de la alergia.

En muchos niños, hay una progresión temporal en el desarrollo de las alergias. (Modificado con autorización de una figura elaborada por Ulrich Wahn para la World Allergy Organization [http:l/www.worldallergy.org]).

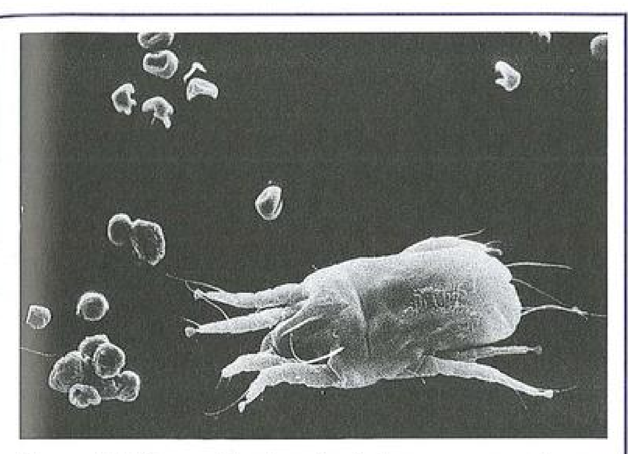


Figura 15.5. Ácaro del polvo doméstico, una causa importante de enfermedad alérgica.

La microfotografía electrónica muestra el ácaro, bastante desagradable, bautizado con el nombre de *Dermatophagoides pteronyssimus* y sus partículas fecales en la parte inferior izquierda. Una cama de dos plazas estándar puede contener hasta 200 millones de ácaros; cada uno produce alrededor de 20 partículas fecales/día y cada una contiene 0,2 ng del alérgeno Der p activo desde el punto de vista proteolítico. Los granos bicóncavos de polen (arriba a la izquierda) representados para su comparación indican que el tamaño de la partícula puede ser transportada por el aire y alcanzar los pulmones. El ácaro en sí es demasiado grande para ser aerotransportado. (Reproducido por cortesía de E. Tovey.)

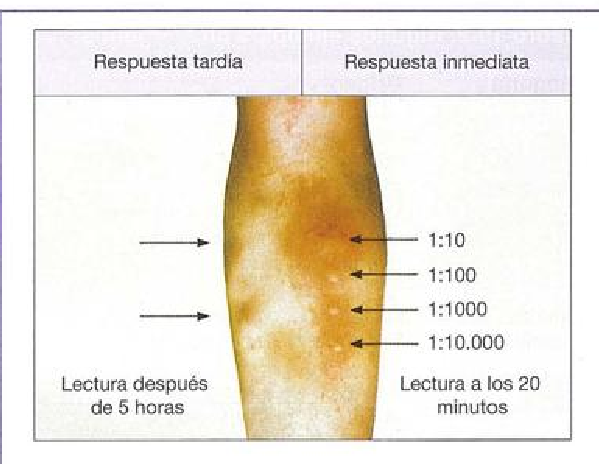


Figura 15.6. Alergia atópica.

Pruebas cutáneas por punción con alérgeno de polen de césped en un caso de fiebre de heno del verano típica. Las pruebas cutáneas se llevaron a cabo 5 horas *(lado izquierdo)* y 20 minutos *(lado derecho)* antes de tomar la fotografía. Las pruebas del lado derecho muestran la titulación característica de una reacción inmediata tipo I de roncha y eritema. La reacción cutánea de fase tardía *(lado izquierdo)* puede observarse con claridad a las 5 horas, sobre todo si fue precedida por una gran respuesta inmediata. Las cifras representan la dilución del alérgeno.

HIV/sida juntos. El asma puede asociarse con agentes que se encuentran en el lugar de trabajo y se la describe como **asma ocupacional**. Los alérgenos son el diisocianato de tolueno en aerosoles de pinturas, humo de colofonia a partir de soldaduras en la industria electrónica y caspa (partículas de piel descamada sobre el pelo de los animales) en el caso de quienes están en contacto con animales. Aunque casi todos los pacientes que padecen la enfermedad tienen **asma extrínseca** asociada con **atopia** (del griego *atopos*, "fuera de lugar"), es decir, la predisposición genética a sintetizar concentraciones inadecuadas de IgE específica para alérgenos externos, algunos pacientes no son atópicos, y por lo tanto se dice que presentan **asma intrínseca o idiopática**.

La biopsia y el lavado bronquial de los pacientes asmáticos revelan un compromiso inequívoco de los **mastocitos** y los **eosinófilos** como las principales células efectoras que secretan mediadores, mientras que las células T proporcionan el microambiente requerido para sostener la respuesta inflamatoria crónica que es una característica esencial de la histopatología (Figura 15.7). La obstrucción variable del flujo aéreo resultante y la respuesta exagerada bronquial son características clínicas y fisiológicas cardinales de la enfermedad.

El rasgo atópico también puede manifestarse como una **dermatitis atópica (eccema)** (Figura 15.8), en la que los ácaros del polvo ambiental, los gatos domésticos y las cucarachas son a menudo los agresores del medioambiente. De manera similar a la inflamación en el asma, las pruebas cutáneas del parche con Der p 1 en estos pacientes eccematosos producen un infiltrado de eosinófilos, células T, mastocitos y basófilos. El número de afectados es comparable con el de los pacientes que experimentan asma. El efecto beneficioso de los inhibidores de la calcineurina, la ciclosporina, y más recientemente del tacrolimús tópico, en pacientes con eccema destaca la función importante de las células T en la patogenia de esta enfermedad.

La consciencia sobre la importancia de la sensibilización de tipo IgE a **los alérgenos de los alimentos** que se produce en el intestino ha aumentado de manera notable. Se ha establecido que el contacto con alérgenos (como los presentes en la leche de vaca, los huevos y los frutos secos y los mariscos) antes de que aparezcan los mecanismos protectores de la mucosa, en especial IgA, conduce a un aumento de

Cuadro 15.2. Algunos ejemplos de alérgenos.

Categoría	Origen	Alérgeno	Ejemplo
Insecto	Heces de ácaros del polvo doméstico (*Dermatophagoides pteronyssinus*) Veneno de abeja *(Apis mellifera)* Cucaracha alemana *(Blatella germanica)*	Der p 1–Der p14 Api m 1–7 Bla g 1–6	Der p 1: cisteína proteasa Api m 1: fosfolipasa A_2 Bla g 2: aspártico proteasa
Animales de compañía	Gato *(Felis domesticus)* Perro *(Canis domesticus)*	Fel d 1–7 Can f 1–4	Fel d 4: lipocalina Can f 3: albúmina
Árboles	Abedul *(Betula verrucosa)* Avellano *(Corylus avellana)*	Bet v 1–7 Cor a 1–11	Bet v 7: ciclofilina Cor a 8: proteína para la transferencia de lípido
Céspedes y plantas	Gramínea timotea *(Phleum pretense)* Raigrás perenne *(Lolium perenne)* Maleza corta (ragweed común) *(Ambrosia artemisiifolia)*	Phl p 1–13 Lol p 1–11 Amb a 1–7	Phl p 13: poligalacturonasa Lol p 11: inhibidor de tripsina Amb a 5: neurofisina
Mohos	*Aspergillus fumigatus* *Cladosporium herborum*	Asp f 1–23 Cla h 1-12	Asp f 12: proteína del choque térmico p90 Cla h 3: aldehído deshidrogenasa
Alimentos	Cacahuete (maní) Leche de vaca *(Bos domesticus)* Huevos de gallina *(Gallus domesticus)*	Ara h 1-8 Bos d 1–8 Gal d 1–5	Ara h 1: vicilina Bos d 4: α-lactalbúmina Gal d 2: ovoalbúmina
Fármacos	Penicilina Fluoroquinolona	– –	Amoxicilina Ciprofloxacino
Alérgenos ocupacionales	Diisocianato de tolueno Látex (proveniente del árbol del hule o caucho, *Hevea brasiliensis)*	– Hev b 1–13	– Hey b 1: factor de elongación

Para un listado completo, véase International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Sub-Committee http://www.allergen.org

la incidencia de atopia en el recién nacido (Figura 15.4). Aunque en general los niños alimentados con leche materna presentan una incidencia menor de alergias, la sensibilización a los alérgenos de la dieta también puede aparecer en la infancia temprana a través del amamantamiento, en el que el antígeno pasa al niño con la leche de la madre. Se puede decir que las madres que amamantan deberían limitar la ingesta de alérgenos comunes. La alergia al cacahuete se observa aproximadamente en el 1% de los niños, y como sucede con otros alérgenos, las reacciones a veces son graves o hasta mortales. Los aditivos de los alimentos, como los agentes a base de sulfitos, pueden causar reacciones adversas. El contacto de los alimentos con la IgE específica localizada sobre los mastocitos del tubo digestivo puede desencadenar reacciones locales como diarrea y vómitos o puede permitir que el alérgeno penetre en el organismo mediante la producción de un cambio en la permeabilidad del intestino por la liberación de mediadores; los alérgenos pueden formar complejos con los anticuerpos y ocasionar lesiones distales por el depósito en las articulaciones, por ejemplo, o pueden difundirse libremente a otros sitios sensibilizados, como la piel (Figura 15.8) o los pulmones, donde causará una reacción anafiláctica local extensa. Así, la ingestión de fresas o frutillas puede producir **reacciones urticarianas** (**ronchas**, áreas sobreelevadas de piel pruriginosa) y el huevo puede precipitar un ataque asmático en individuos sensibilizados. El papel del intestino sensibilizado al actuar como "puerta" para la entrada del alérgeno es sugerido fuertemente por experimentos en los que el cromoglicato de sodio oral, un estabilizador de los mastocitos, previno el asma después de la ingestión del alimento desencadenante (Figura 15.9).

La **alergia anafiláctica a los fármacos** se manifiesta en las respuestas a fármacos como la **penicilina**, que por acoplamiento covalente se une a proteínas haptenos del cuerpo para inducir la síntesis de IgE. En el caso de la penicilina, el anillo betalactámico se une al β-amino de la lisina para formar el determinante peniciloilo. La especificidad fina de los anticuerpos IgE permite la discriminación entre fármacos muy similares, porque algunos pacientes pueden ser alérgicos a la amoxicilina pero tolerar la bencilpenicilina, de la cual sólo difiere por modificaciones muy pequeñas de las cadenas laterales.

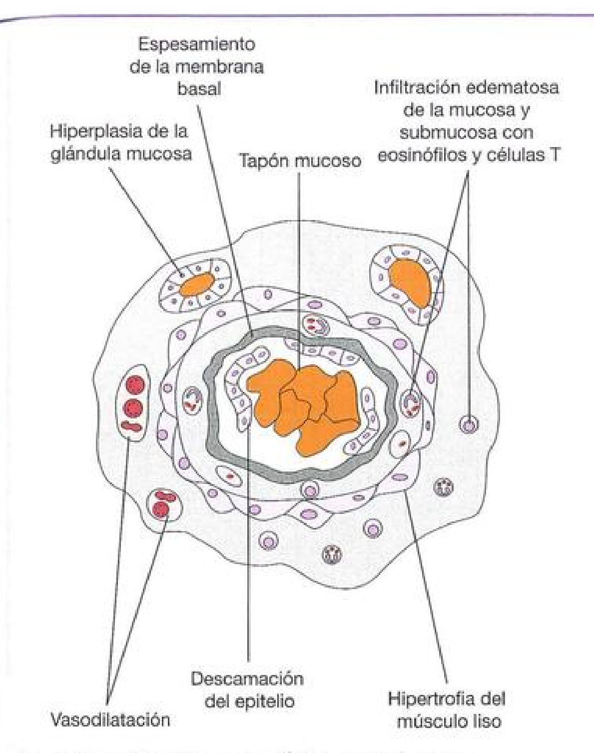


Figura 15.7. Cambios patológicos en el asma.

Diagrama de un corte de una vía aérea en el asma grave.

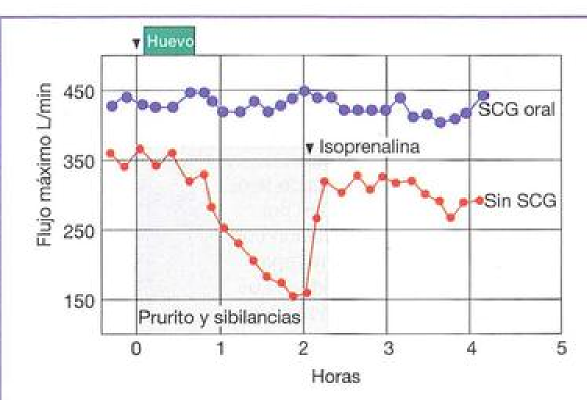


Figura 15.9. Papel de la sensibilidad del intestino a los alérgenos de alimentos en el desarrollo del asma.

Un paciente expuesto por la ingestión de huevo desarrolló asma en el curso de horas, como se muestra aquí por la prueba de la función pulmonar deprimida con la determinación del flujo aéreo máximo; los síntomas en el estadio de órgano terminal fueron contrarrestados por agonistas del adrenorreceptor β como la isoprenalina. Sin embargo, el cromoglicato de sodio oral (SCG), que impide la activación específica de antígeno del mastocito, también previene la instalación de asma tras la exposición oral con huevo. Obsérvese que el SCG por vía oral no tiene efecto sobre la respuesta de un asmático al alérgeno inhalado. (De Brostoff J. [1986]. En Brostoff J. y Challacombe S.J. [eds.] *Food Allergy*, p. **441**. Baillière-Tindall, London, reproducido con autorización.)



Figura 15.8. Una reacción de eccema atópico en el hueco poplíteo de un niño alérgico al arroz y al huevo.

(Proporcionada por gentileza de J. Brostoff.)

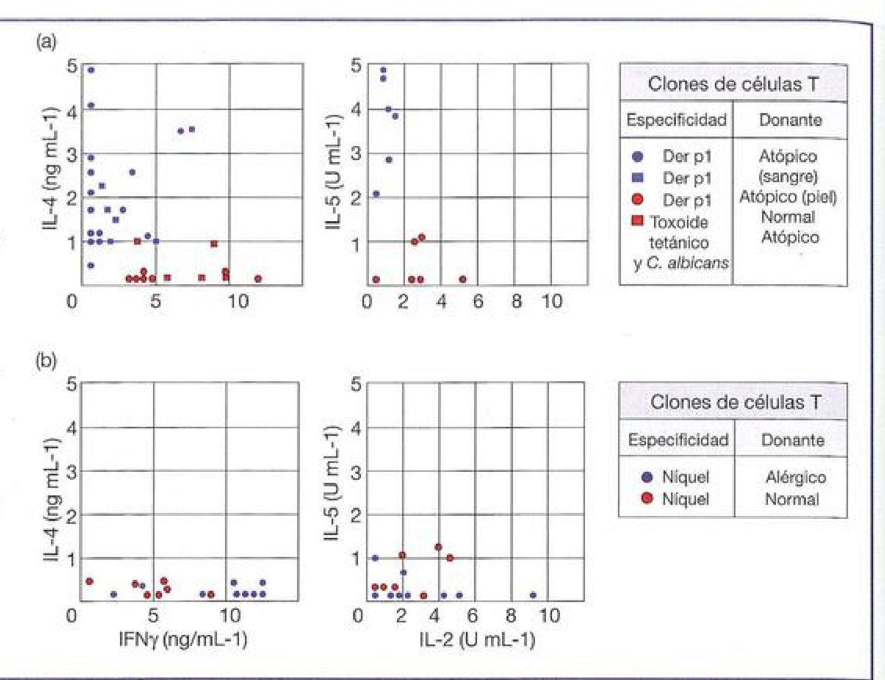
Mecanismos patológicos en el asma

Ahora estudiaremos con más profundidad aquellos procesos que generan la cronicidad del asma. Recuérdese que existe una *fase temprana* de la respuesta bronquial para el antígeno inhalado, que involucra en esencia los mediadores de los mastocitos, y una *fase inflamatoria tardía* dominada por los eosinófilos. **Ambas fases son dependientes de la IgE**, como se demuestra por su marcada atenuación en la gran mayoría de los pacientes asmáticos tratados con un anticuerpo monoclonal humanizado, omalizumab, que reduce la IgE a concentraciones casi indetectables. Los mastocitos activados producen IL-11, que contribuiría al desarrollo de los cambios estructurales asociados con el asma denominados **remodelamiento de las vías aéreas**, es decir, el engrosamiento de las paredes de las vías aéreas y el aumento de la adventicia (la capa más externa de tejido conectivo), el tejido de la submucosa y el músculo liso. Los mastocitos también contribuyen en el reclutamiento de eosinófilos mediante la secreción de triptasa, que puede activar el receptor para el factor II de tipo 1 de la coagulación (F2RL1, receptor activado por proteasa-2 [PAR-2]) en la superficie de las células endoteliales y epiteliales, fibroblastos y músculo liso. La activación del receptor conduce a la producción de TNF, IL-1 e IL-4, que estimulan la expresión de moléculas de adhesión VCAM-1, ICAM-1 y selectina P que reclutan eosinófilos y basófilos. Un activador importante de la reacción de fase tardía es la **activación de macrófagos alveolares** a través de la interacción del alérgeno con la IgE unida a los receptores de baja afinidad FcεRII, lo cual determina un aumento significativo en la producción de TNF e IL-1β. Estos citocinas estimulan la liberación de poderosas **sustancias quimiotácticas para eosinófilos** CCL5 (RANTES), CCL11 (eotaxina) y CCL12 (MCP5) provenientes de las células epiteliales y fibroblastos bronquiales. Obsérvese también que la CCL5 y ccL11 pueden contribuir directamente a la inflamación local por la desgranulación de basófilos independiente de la IgE.

Ahora ingresa un nuevo jugador en el campo: las células T sensibilizadas se dirigen hacia el sitio inflamado por la influencia de CCL11. El factor de transcripción GATA-3, c-maf y la presencia de prostaglandina E_2 estimulan el **desarrollo de Th2**, y las respuestas están intensamente desviadas hacia esta subpoblación particular de células T en el **asma** (Figura 15.10). El encuentro con los péptidos prove-

Figura 15.10. Predominio de Th2 en la alergia atópica.

Demostrado por los perfiles de citocina de clones de células T CD4+ específicos para el antígeno a partir de: a) pacientes con alergia atópica de tipo I, y b) individuos con sensibilidad por contacto de tipo IV, en comparación con controles normales. Cada punto representa el valor de un clon individual. Los clones Th1 arquetípicos tienen niveles elevados de IFNγ e IL-2 y bajos de IL-4 e IL-5; los clones Th2 muestran lo inverso. El nivel elevado de IL-4 dirige el cambio a la producción de IgE por las células B y estimula más la desviación hacia Th2. (Datos de Kapsenberg M.L., Wierenga E. A., Bos J.D. y Jansen H.M. [1991] *Immunology Today* **12**, 392.)



nientes del alérgeno en la célula presentadora del antígeno promoverá la síntesis de IL-4, IL-5 e IL-13. La IL-4 estimula más aún la liberación de CCL11, mientras que la IL-5 sobreexpresa los receptores para quimiocina en los eosinófilos, mantiene su supervivencia a través de un efecto inhibidor en la apoptosis natural y está involucrada en su reclutamiento a largo plazo desde la médula ósea. Las células Th17 también están presentes y estimulan las respuestas inflamatorias tanto de neutrófilos como de macrófagos en el pulmón.

Las cosas ahora parecen empeorar para los tejidos bronquiales y una multitud de factores contribuye a la disfunción de la vía aérea inducida por el alérgeno: 1) una "sopa" de broncoconstrictores baña las células del músculo liso y los leucotrienos adquieren especial importancia; 2) el edema de la pared de la vía aérea; 3) la regulación nerviosa alterada del tono de la vía aérea a través de la unión de la proteína básica principal (MBP) de los eosinófilos a los autorreceptores M2 de las terminaciones nerviosas, con aumento en la liberación de acetilcolina; 4) la descamación de las células epiteliales de la vía aérea por la acción tóxica de MBP, con una correlación intensa entre el número de células descamadas en el líquido de lavado broncoalveolar y la concentración de MBP; 5) la hipersecreción de moco debida a la IL-13 y, en menor grado, a la IL-4, los leucotrienos y el factor activador de plaquetas que actúan en las glándulas de la submucosa y en sus elementos nerviosos controladores; y por último 6) una respuesta reparadora que implica la producción de factor de crecimiento de fibroblastos, TGFβ y factor de crecimiento derivado de las plaquetas, la cubierta de colágeno, la cicatrización y el tejido fibroso y la hipertrofia de músculo liso, lo cual conduce a un estrechamiento exagerado de las vías aéreas en respuesta a una variedad de estímulos ambientales (Figura 15.7). La amplia gama de citocinas y mediadores producida por las células epiteliales y endoteliales pulmonares, los fibroblastos y las células del músculo liso puede ser la responsable de la persistencia de la inflamación de la vía aérea y los cambios estructurales permanentes que se observan en la enfermedad crónica, incluso en ausencia real o aparente de exposición continua a alérgenos inhalados a los que los pacientes están sensibilizados, estado en el que la inmunoterapia convencional presumiblemente no será beneficiosa.

A diferencia de los asmáticos atópicos, en los **asmáticos intrínsecos** las pruebas cutáneas son negativas a los *aeroalérgenos* comunes, carecen de antecedentes clínicos o familiares de alergia y hay concentraciones normales de IgE sérica y falta de anticuerpos IgE específicos detectables contra alérgenos comunes. No obstante, se asemejan a los pacientes atópicos en varios aspectos importantes: las biopsias bronquiales muestran un aumento de la expresión de IL-4, IL-13, CCL5 y CCL11, y del mRNA para la cadena pesada ε, sugestivo de la síntesis de IgE local. ¿Cumplen alguna función la IgE específica para virus o los autoanticuerpos de IgE contra el FcεRI?

El infiltrado inflamatorio en la **dermatitis atópica** se asemeja al del asma y está constituido por mastocitos, basófilos, eosinófilos y células T. Las células dendríticas epidérmicas expresan FcεRI y los alérgenos entrantes son captados como complejos alérgeno-IgE y pasan a la vía de procesamiento de las moléculas de clase II del CMH para la presentación a las células Th2. Las quimiocinas CC producidas por los queratinocitos y los fibroblastos atraen sobre todo eosinófilos y células Th2 de memoria CLA+ residentes en la piel. Éstas representan del 80 al 90% de las células T en el infiltrado y son responsables de la respuesta específica al alérgeno agresor.

Factores etiológicos en el desarrollo de la alergia atópica

Hay una fuerte predisposición familiar en el desarrollo de la alergia atópica (Figura 15.11), lo que sugiere factores

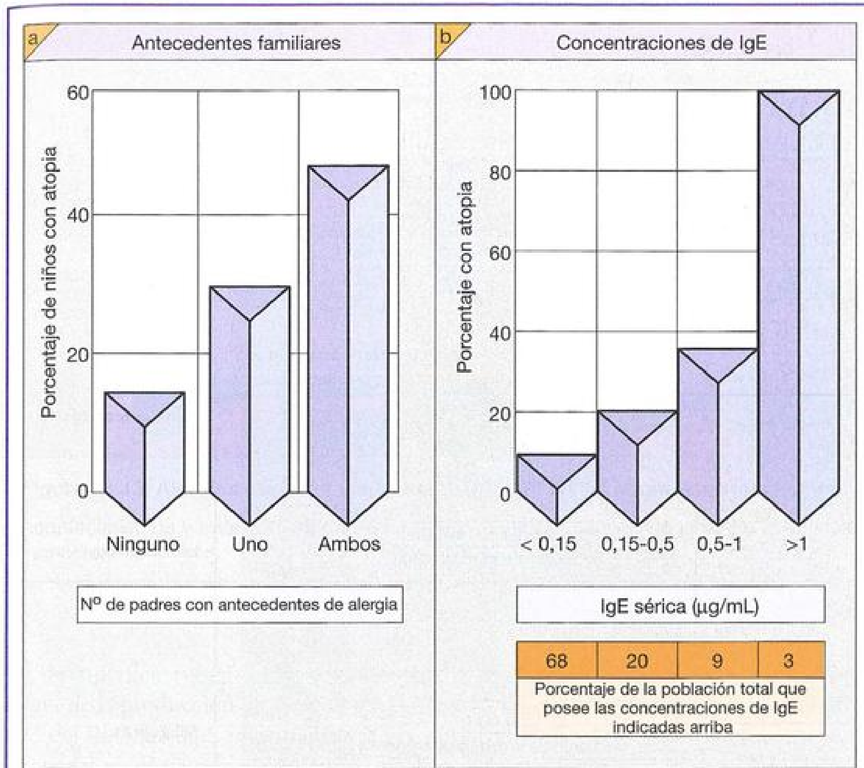


Figura 15.11. Factores de riesgo en la alergia.

a) Antecedentes familiares; b) concentraciones de IgE; cuanto mayor es la concentración de IgE sérica, mayor es la posibilidad de desarrollar atopia.

genéticos. En realidad, está claro que el desarrollo de la alergia atópica depende de las varias interacciones complejas con diversos factores ambientales. Influyen la edad, el sexo, los antecedentes de infecciones, el estado nutricional y la exposición al alérgeno. Un factor evidente es la capacidad global para sintetizar el isotipo de IgE: cuanto más alta la concentración de IgE en sangre, mayor es la probabilidad de que el individuo se torne atópico (Figura 15.11). Los estudios genéticos demuestran que muchos genes distintos contribuyen a desarrollar asma (Figura 15.12), aunque ningún gen único es, por sí mismo, un factor predisponente particularmente fuerte. Sin embargo, una asociación interesante es con los polimorfismos en ciertos receptores de reconocimiento de patrón (PRR). ¿Qué importancia podría tener esto en la enfermedad atópica? El reconocimiento mediado por PRR de los patógenos por las células dendríticas es importante en el desarrollo del equilibrio correcto entre las respuestas Th1 y Th2. Las corrientes de pensamiento actuales se resumen en las siguientes líneas. Al nacer, el sistema inmunitario está desviado hacia las respuestas de tipo Th2, pero cuando se enfrenta a ambientes microbianos hostiles hay una desviación hacia las respuestas Th1. Este cambio se extiende a los alérgenos inhalados y en oportunidades se denomina desviación inmunitaria. Sin embargo, en ausencia de infecciones repetidas con patógenos comunes (debido a un ambiente "más limpio" y el uso temprano difundido de antibióticos), el sistema inmunitario mantiene un fenotipo Th2 que favorecerá la secreción de IL-4 (que estimula la producción de IgE) e IL-5 (que estimula la eosinofilia). Este concepto es la base de la hipótesis higiénica para explicar el origen de las alergias observadas en los países altamente desarrollados e incluso de manera más reveladora en los países *que se conviertem* en altamente desarrollados, como la ex Alemania Oriental del Este, donde los niveles de alergia atópica comenzaron a alcanzar a los de Alemania Occidental tras la reunificación. Sin embargo, el cuadro global en relación con el desarrollo económico es complejo: no debe olvidarse que se han señalado como contaminantes ambientales a las partículas de tubos de escape diesel como cofactores para los ataques de asma.

En los últimos tiempos, también ha habido un gran interés en tratar de comprender el papel de la función de barrera del epitelio en las respuestas alérgicas. El compromiso de las uniones normalmente estrechas entre las células epiteliales, tal vez causadas por contaminantes químicos o físicos o por la infección, claramente conducirá a un mayor acceso de ambos, alérgenos y agentes patógenos. Otra pieza del rompecabezas se relaciona con la función de las células T reguladoras (Treg) en la enfermedad atópica. Hay cada vez más pruebas de una deficiencia de estas células en los pacientes con alergia, en la que están implicadas las células Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, que aparecen en forma natural, y las Treg inducibles. Las Treg pueden ser influidas por interacciones con subpoblaciones definidas de células dendríticas. ¿Y dónde encajan las células Th17 en todo esto? Como dicen, el tema merece seguimiento.

Pruebas clínicas para la alergia

La sensibilidad suele evaluarse por la respuesta al desafío intradérmico con el antígeno. La liberación de histamina y otros mediadores produce rápidamente una reacción de **roncha y eritema** (Figura 15.6), que alcanza el máximo en el curso de 30 minutos y luego se reduce. Estas reacciones

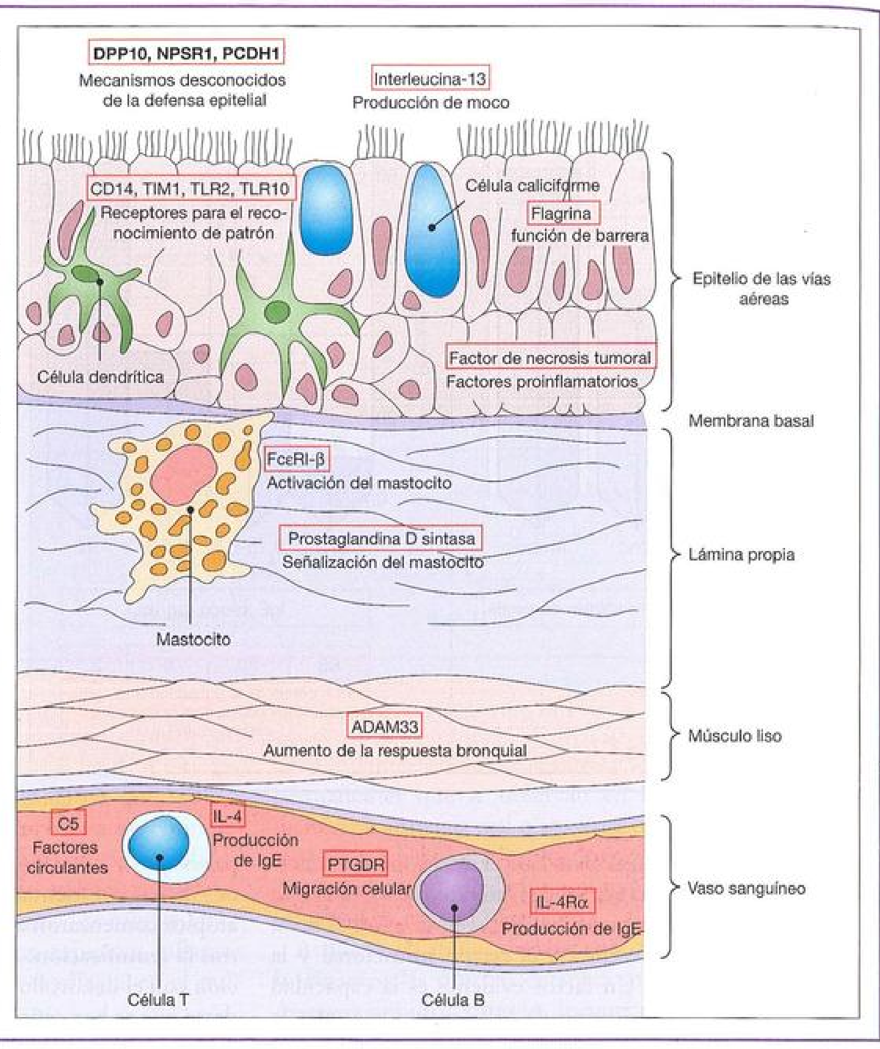


Figura 15.12. Productos génicos que influyen en la susceptibilidad al asma.

Se han implicado múltiples genes que actúan en diversas etapas de la respuesta de hipersensibilidad de tipo I. ADAM33, proteína 33 que contiene dominios de desintegrina y metaloproteína; DPP10, dipeptidil peptidasa 10; NPSR1, receptor 1 del neuropéptido S; PCDH1, protocadherina-1; PTGDR, receptor para prostaglandina D_2; TIM1, proteína 1 que contiene dominios de mucina e inmunoglobulina de la célula T. (Modificado de Cookson W. y Moffatt M. (2004) *New England Journal of Medicine* **351**,1794-1796, con autorización.)

inmediatas de roncha y eritema pueden ser seguidas por una reacción de fase tardía (véase la Figura 15.6) que en oportunidades perdura 24 horas y que recuerda a las observadas después de la exposición de la mucosa bronquial y nasal de pacientes alérgicos y están caracterizadas, asimismo, por un infiltrado denso de eosinófilos y células T.

La correlación entre las respuestas de la prueba cutánea por punción y la prueba con **radioalergosorbentes** (RAST para la IgE sérica específica para el alérgeno es bastante buena. En algunos casos, la exposición intranasal al alérgeno puede provocar una respuesta aun cuando ambas pruebas son negativas, probablemente como resultado de la síntesis local de anticuerpos IgE. La presencia de proteínas secretadas por los mastocitos o los eosinófilos en el suero o la orina podría proporcionar importantes marcadores sustitutos de enfermedad y predecir exacerbaciones.

Tratamiento

Si se considera la secuencia de reacciones desde la exposición inicial al alérgeno hasta la producción de la enfermedad atópica, puede apreciarse que varios puntos en la cadena proporcionan objetivos válidos para el tratamiento (Figura 15.13).

Evitar el alérgeno. Evitar el contacto con los alérgenos *potenciales* a menudo es poco práctico, aunque, para dar un ejemplo, sea desaconsejable alimentar con leche de vaca a los lactantes de muy corta edad. Tras la sensibilización, obviamente sirve evitar la exposición cuando sea posible, si bien la renuencia de algunos padres a deshacerse del gato de la familia para detener las sibilancias de su hijo es a veces bastante sorprendente.

Modulación de la respuesta inmunitaria. Los esfuerzos tendientes a la desensibilización de los pacientes mediante **inyecciones subcutáneas** repetidas de cantidades pequeñas del alérgeno pueden conducir a una importante mejoría en pacientes con anafilaxia al veneno de insectos o con rinoconjuntivitis alérgica estacional. La **inmunoterapia con el alérgeno sublingual** (SLIT; *sublingual allergen immunotherapy*) le insume menos del tiempo al paciente y tiene menos riesgo de reacciones sistémicas graves que la administración subcutánea; pero esto debe ser sopesado frente al hecho de que no es tan eficaz como la inmunoterapia inyectable.

El propósito del tratamiento de hiposensibilización fue originalmente el de estimular la síntesis de anticuerpos "bloqueadores", cuya función era desviar el alérgeno del contacto con la IgE unida al tejido. Si bien esto puede ser un factor contribuyente, también parece probable la inhibición de la síntesis de IgE por la ocupación del receptor de FcγRIIB en las células B por IgG específica para el alérgeno ligada a las moléculas del alérgeno que se unen con los receptores para

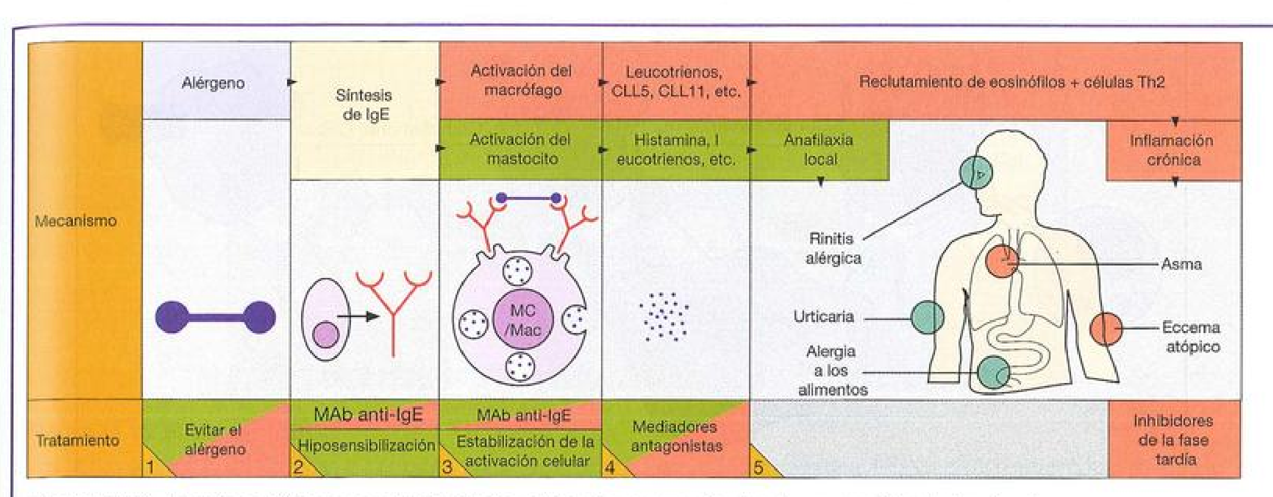


Figura 15.13. Alergias atópicas y su tratamiento: sitios de respuestas locales y posibles tratamientos.

Acontecimientos y tratamientos que relacionan la anafilaxia local *(en verde)* y la inflamación crónica *(en rojo)*. Mab, anticuerpo monoclonal.

IgE de superficie (véase el Capítulo 10 sobre la regulación de la IgG de la producción de anticuerpos). Además, la cooperación del linfocito T es importante para la síntesis de IgE y la patogenia mediada por eosinófilos, y por lo tanto, los efectos beneficiosos de la inyección de antígeno también pueden estar mediados por la inducción de células T anérgicas o reguladoras y un cambio de producción de citocina de Th2 a Th1. La administración de bacilos de *Mycobacterium vaccae* muertos por calor induce la secreción de IL-10 y TGFβ por las células T reguladoras, con la consiguiente disminución de la actividad de Th2. La inhibición del factor de transcripción asociado con Th2 GATA-3 que utiliza agonistas PPAR (receptor activado por el proliferador de peroxisoma) o la estimulación de la expresión de T-bet asociada a Th1 con motivos CpG puede proporcionar opciones terapéuticas futuras para estimular respuestas de Th1 en lugar de Th2. La administración de epítopos peptídicos tolerizantes o antagonistas constituye otra modalidad terapéutica posible. Felizmente, la mayoría de los pacientes responde a un número notablemente limitado de epítopos de células T en un alérgeno dado; en consecuencia, puede que no sea necesario adaptar el péptido terapéutico a cada paciente. Los ensayos clínicos de inmunoterapia con péptidos derivados de Fel d 1 provenientes del alérgeno del gato han dado como resultado una disminución de las reacciones tanto tempranas como tardías. Hay razones para considerar la hiposensibilización profiláctica de niños con dos padres asmáticos, los cuales tienen al menos una probabilidad del 50% de desarrollar la enfermedad.

Bloqueo de la acción de IgE. Ya hemos mencionado al anticuerpo monoclonal humanizado **Omalizumab** dirigido contra el dominio Cε3 de unión al FcεRI de la IgE, que proporciona una terapéutica nueva para las formas graves del asma. Reduce las concentraciones de IgE circulante casi hasta el punto de la desaparición por neutralización directa y, como efecto secundario, disminuye la expresión dependiente de IgE del receptor FcεR de los mastocitos. Por ello, hay muchos menos receptores sobre el mastocito para la unión de la IgE, y prácticamente no hay IgE para unirse. No sorprende entonces que se hayan completado con éxito los ensayos clínicos de fase II con este anticuerpo y que haya sido aprobado después por la FDA para el uso en adultos y adolescentes con asma atópica persistente, moderada o grave, cuyos síntomas eran controlados de modo inadecuado con la inhalación de corticosteroides.

Estabilización de las células estimuladas. Se ha obtenido mucho beneficio con agentes como la **isoprenalina** por inhalación y el **cromoglicato de sodio** (cromolín sódico), que mantienen a los mastocitos resistentes a la activación. El cromoglicato de sodio bloquea la actividad de los canales de cloro y mantiene a las células en un estado fisiológico de reposo normal, el cual probablemente ejerce efectos inhibidores sobre una amplia gama de funciones celulares, como la desgranulación de los mastocitos, la quimiotaxis de eosinófilos y neutrófilos y la liberación de mediadores, y la broncoconstricción refleja. Algunos o la totalidad de estos efectos determinan sus acciones antiasmáticas.

La activación de los macrófagos a través de la interacción del alérgeno con la IgE unida a la superficie es indudablemente un factor de iniciación fundamental para las reacciones tardías, como se mencionó antes, y la resistencia contra este estímulo puede lograrse de manera muy eficaz con los corticosteroides. Sin duda, los **corticosteroides inhalados** revolucionaron el tratamiento del asma. Su acción principal es suprimir la transcripción de múltiples genes inflamatorios, que en el contexto presente incluyen los que codifican la producción de citocinas.

Antagonismo de mediadores. Hace tiempo se demostró que los **antagonistas de los receptores histamínicos H_1** son útiles en el tratamiento sintomático de la enfermedad atópica. Los fármacos más nuevos como **loratadina** y **fexofenadina** tienen eficacia en la rinitis y reducen el prurito en la dermatitis atópica, aunque su beneficio en el asma es escaso. La **cetirizina** presenta además efectos útiles en el reclutamiento de eosinófilos en la reacción de fase tardía. Un adelanto actual de importancia fue la introducción de **β_2-agonistas**

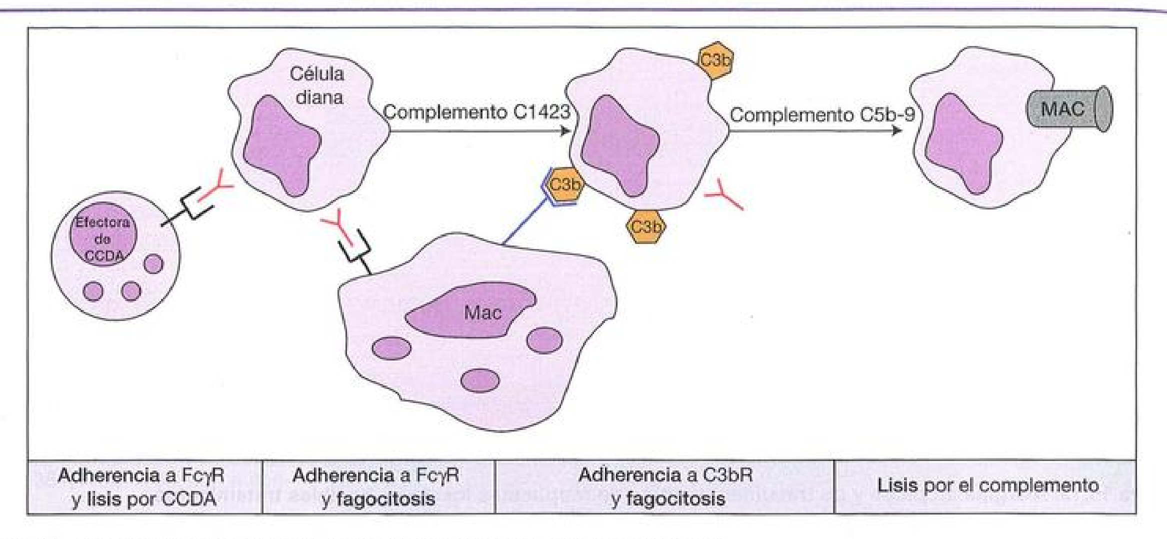


Figura15.14. Hipersensibilidad citotóxica dependiente de anticuerpos (tipo II).

Los anticuerpos dirigidos contra los antígenos de superficie de la célula no sólo causan la muerte celular por lisis dependiente del C, que utiliza el complejo de ataque de membrana (MAC) C5b-C9, sino también por reacciones de adherencia de Fcγ y C3b que conducen a la fagocitosis, o a través de la muerte extracelular no fagocítica por **citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA).** Los monocitos humanos y los neutrófilos activados por el IFNγ destruyen las células tumorales recubiertas por anticuerpos mediante el uso de sus receptores FcγRI; las células NK destruyen sus dianas a través de los receptores FcγRIII.

de acción prolongada, como Ventolin®, cuyo principio activo es el **albuterol** (salbutamol), los cuales se inhalan para aliviar los síntomas leves a moderados del asma. Estos fármacos agonistas de receptores β-adrenérgicos aumentan los niveles de cAMP y llevan a la relajación del músculo liso bronquial y a la inhibición de la desgranulación del mastocito. Un adelanto importante fue la introducción de **agonistas β de acción prolongada**, como salmeterol y formoterol, que protegen contra la broncoconstricción durante más de 12 horas. Los potentes **antagonistas del receptor para leucotrieno** como el **pranlukast** también bloquean los efectos constrictores y muestran una llamativa eficacia en ciertos pacientes, sobre todo en los asmáticos sensibles a la aspirina.

La **teofilina** fue introducida en el tratamiento del asma hace más de 60 años. Como un **inhibidor de la fosfodiesterasa (PDE)**, aumenta el cAMP intracelular, y por lo tanto produce broncodilatación, inhibición de la supervivencia de los eosinófilos inducida por IL-5 y tal vez supresión de la migración de eosinófilos al interior de la mucosa bronquial. En general, buenas noticias para el paciente, aunque por la preocupación acerca de algunos efectos colaterales sólo se lo utiliza cuando otras opciones terapéuticas resultaron ineficaces.

Ataque de la inflamación crónica. Ciertos fármacos impiden la enfermedad atópica en más de una fase. La **cetirizina** es un ejemplo puntual, con sus efectos dobles sobre el receptor de histamina y sobre el reclutamiento de eosinófilos. Los **corticosteroides** parecen actuar en casi todas las fases; aparte de su papel estabilizador de los macrófagos, inhiben de manera sustancial la activación y proliferación de las células Th2, que son la fuerza del impulso subyacente dominante en el asma crónica, y pueden detener el desarrollo del estrechamiento irreversible de las vías aéreas. Así actúan los esteroides inhalados (p. ej., budesonida, furoato de mometasona, propionato de fluticasona) de alto poder antiinflamatorio pero efectos colaterales mínimos debido a su metabolismo hepático, que proporcionan la primera línea terapéutica para la mayoría de los asmáticos crónicos, con el suplemento de β_2-agonistas de acción prolongada.

Hipersensibilidad citotóxica dependiente de anticuerpos (tipo II)

Cuando un antígeno está presente en la superficie de una célula, la combinación con el anticuerpo estimulará la muerte de esa célula al promover el contacto con los fagocitos mediante la **adherencia opsónica** a los receptores Fcγ y, con frecuencia, a los receptores para C3b tras la activación del complemento por la vía clásica. La muerte celular también puede producirse a través de la activación total del sistema del complemento hasta C8 y C9, que causan **daño directo de la membrana** (Figura 15.14), aunque esto tendrá que superar el efecto protector de las proteínas reguladoras del complemento de la superficie celular.

Un mecanismo citotóxico bastante distinto, la **citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA),** tiene lugar cuando son destruidas las células diana recubiertas con anticuerpos IgG o IgE a través de un proceso no fagocítico extracelular que implica la unión de los leucocitos a su diana por sus receptores Fc específico, por ejemplo, FcγR en el caso de la IgG (Figura15.14). La CCDA puede estar mediada por diferentes tipos de leucocitos, como células NK, monocitos, neutrófilos y eosinófilos. Aunque se observa fácilmente cómo un fenómeno *in vitro*, por ejemplo, las esquistosómulas cubiertas con IgG o IgE pueden ser destruidas por los eosinófilos (véase la Figura 12.25), sigue

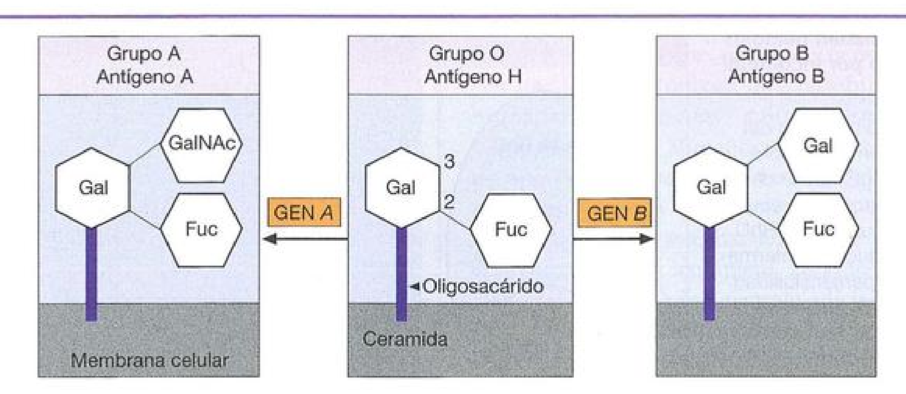


Figura 15.15. El sistema ABO.

Los genes alélicos A y B codifican las enzimas transferasas, que agregan *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) o galactosa (Gal), respectivamente, a la sustancia H. El oligosacárido está anclado a la membrana celular por acoplamiento a una esfingomielina denominada ceramida. El 85% de la población secreta sustancias del grupo sanguíneo en la saliva, donde los oligosacáridos están presentes como conjugados polipeptídicos solubles formados bajo la acción de un gen secretor (*se*). Fuc, fucosa.

Cuadro 15.3. Grupos sanguíneos AB0 y anticuerpos séricos.

Grupo sanguíneo (fenotipo)	Genotipo	Antígeno	Anticuerpos séricos
A	*AA, A0*	A	Anti-B
B	*BB, B0*	B	Anti-A
AB	*AB*	A y B	Ninguno
O	*00*	H	Anti-A Anti-B

siendo un interrogante no resuelto si la CCDA participa *in vivo.* Desde el punto de vista funcional, se presume que este mecanismo citotóxico extracelular resulta de importancia cuando la diana es demasiado grande para la ingestión por fagocitosis, como es el caso de parásitos de gran tamaño y tumores sólidos. También podría actuar como un sistema de reserva para la destrucción mediada por células T.

Reacciones de tipo II entre miembros de la misma especie (aloinmunitarias)

Reacciones transfusionales

De los muchos componentes polimórficos diferentes de la membrana de los eritrocitos humanos, los **grupos sanguíneos AB0** constituyen el sistema dominante. Los grupos antigénicos A y B derivan de la sustancia H (Figura 15.15) por acción de las glucosiltransferasas codificadas por los genes *A* y *B,* respectivamente. Los individuos con ambos genes (grupo AB) tienen dos antígenos en sus eritrocitos, mientras que quienes carecen de estos genes (grupo 0) sintetizan sólo la sustancia H. Los anticuerpos contra A o B aparecen de manera espontánea cuando el antígeno está ausente en la superficie del eritrocito; así, una persona del grupo sanguíneo A tendrá anticuerpos anti-B y así sucesivamente. Estas **isohemaglutininas** suelen ser IgM y es probable que pertenezcan a la clase de "anticuerpos naturales"; serían estimuladas por el contacto con antígenos de la flora intestinal, que desde el punto de vista estructural son similares a los hidratos de carbono del grupo sanguíneo, de modo que los anticuerpos formados reaccionan en forma cruzada con el tipo de eritrocito apropiado. Si un individuo es del grupo sanguíneo A, sería tolerante a antígenos estrechamente similares a A y sólo formaría anticuerpos que reaccionan de manera cruzada capaces de aglutinar los eritrocitos B; de igual modo, un individuo del grupo 0 elaboraría anticuerpos anti-A y anti-B (Cuadro 15.3). Cuando se realiza una transfusión, los eritrocitos no compatibles estarán recubiertos por las isohemaglutininas y causarán hemólisis intravascular intensa mediada por complemento.

Con frecuencia, la resistencia clínica a las transfusiones de plaquetas se debe a la aloinmunización HLA, pero este problema puede resolverse mediante la depleción de las plaquetas de la suspensión de leucocitos.

Incompatibilidad Rh

Los **factores sanguíneos Rh (rhesus)** forman el otro sistema antigénico principal, entre los cuales el antígeno RhD es el de mayores consecuencias para las reacciones isoinmunitarias. Una madre con el grupo sanguíneo RhD negativo (es decir, genotipo *dd*) puede ser sensibilizada con facilidad por los eritrocitos del hijo que porta antígenos RhD (genotipo *DD* o *Dd*). Esto es más frecuente con el nacimiento del primer niño, cuando la hemorragia placentaria puede liberar gran cantidad de eritrocitos del feto en la madre. Los

Figura 15.16. Enfermedad hemolítica del recién nacido por incompatibilidad rhesus.

a) Los eritrocitos RhD positivos del primer hijo sensibilizan a la madre RhD negativa. b) La IgG anti-D de la madre atraviesa la placenta y recubre los eritrocitos del segundo feto RhD positivos, lo cual produce la enfermedad hemolítica por hipersensibilidad tipo II. c) La IgG anti-D administrada en forma profiláctica con el primer nacimiento elimina los eritrocitos del hijo mediante fagocitosis y evita la sensibilización de la madre.

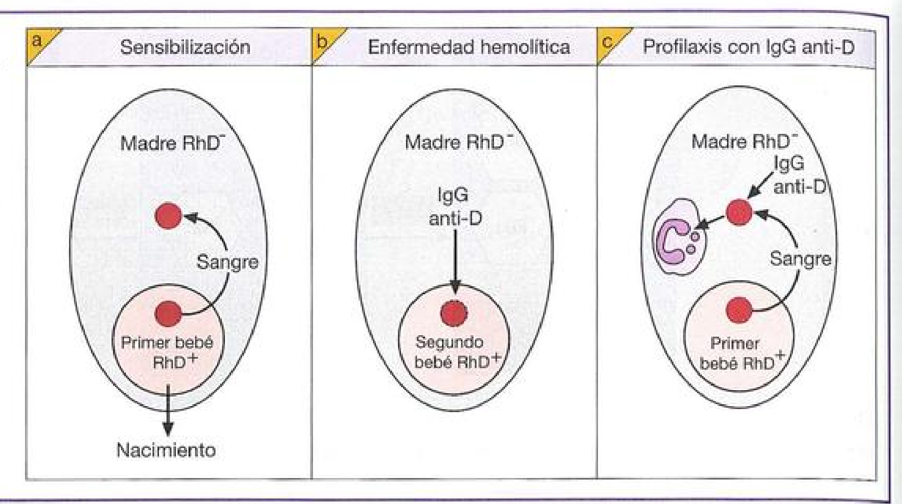
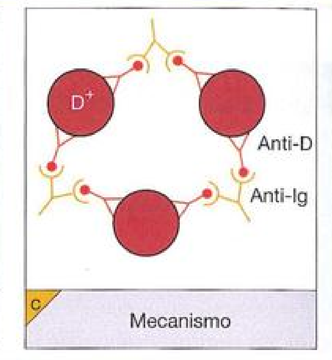


Figura 15.17. La prueba de Coombs para eritrocitos recubiertos con anticuerpos.

Esta prueba se utiliza para detectar los anticuerpos rhesus y para el diagnóstico de anemia hemolítica autoinmunitaria (Las fotografías son gentileza de A. Cooke.)







anticuerpos formados son sobre todo de la clase IgG y, a diferencia de la IgM anti-A y anti-B mencionada antes para el sistema de grupo sanguíneo AB0, pueden atravesar la placenta en cualquier embarazo posterior. La reacción con el antígeno D en los eritrocitos fetales conduce a su destrucción a través de la adherencia opsónica, que causa enfermedad hemolítica en el recién nacido (Figura 15.16a y b).

Estos anticuerpos anti-D no pueden aglutinar eritrocitos RhD positivos *in vitro* ("anticuerpos incompletos") porque la baja densidad de los sitios antigénicos no permite que se formen suficientes puentes de anticuerpos entre los eritrocitos con carga negativa para superar las fuerzas electrostáticas de repulsión. Se puede facilitar la aglutinación de los eritrocitos recubiertos con anti-D agregando albúmina o suero antiinmunoglobulina (reactivo de Coombs; Figura 15.17).

Si una madre tiene isohemaglutininas naturales que pueden reaccionar con los eritrocitos del feto que llegan a su circulación, la sensibilización contra los antígenos D es menos probable si se "retiran" los eritrocitos e impide que entren en contacto con las células sensibles al antígeno. Así, una madre de grupo 0 RhD negativo con un hijo del grupo A RhD positivo destruye todos los eritrocitos fetales que entran en contacto con su sangre con su anti-A antes de poder inmunizarse para producir anti-D. En una extensión de este principio, **las madres RhD negativo hoy son tratadas de manera profiláctica** con cantidades pequeñas de IgG anti-D en el momento del nacimiento del primer niño para reducir, en gran medida, el riesgo de sensibilización en un embarazo posterior. Un éxito más de la inmunología.

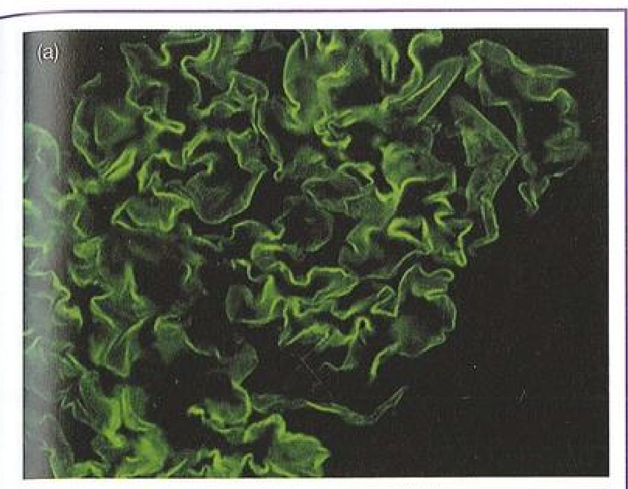
Otro ejemplo de enfermedad que se produce por el pasaje transplacentario de anticuerpos maternos es la **trombocitopenia aloinmunitaria neonatal.** La disminución del número de plaquetas mejora mucho con la administración intravenosa de dosis altas de IgG proveniente de una mezcla de sueros humanos (IgIV). La eficacia de los fragmentos Fcγ y de anti-FcγR sugiere que esto se produce por bloqueo de los receptores Fcγ.

Trasplantes de órganos

Los aloinjertos pueden generar anticuerpos humorales en el huésped dirigidos contra los antígenos de superficie de trasplante. Éstos pueden tener acción citotóxica directa u ocasionar la adherencia de las células fagocíticas o el ataque "inespecífico" por CCDA. Los anticuerpos también pueden conducir a la adherencia plaquetaria cuando se combinan con los antígenos en la superficie del endotelio vascular (Figura 16.6). El rechazo hiperagudo es mediado por anticuerpos preformados en el receptor del injerto.

Reacciones de hipersensibilidad autoinmunitaria tipo II

En la **anemia hemolítica autoinmunitaria** se producen autoanticuerpos contra los eritrocitos propios del paciente. Reaccionan a 37 °C con epítopos de los antígenos del complejo rhesus distintos de los que desencadenan las reacciones



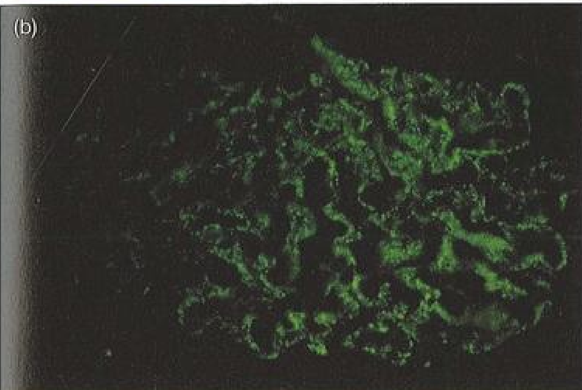


Figura 15.18. Glomerulonefritis.

a) En el síndrome de Goodpasture por hipersensibilidad de tipo II con depósito lineal de anticuerpos en la membrana basal del glomérulo, se visualiza aquí mediante la tinción en la biopsia del riñón humano con anti-IgG fluorescente; en contraste de b) en el lupus eritematoso sistémico (LES) la hipersensibilidad de tipo III se asocia con el depósito de complejos antígeno-anticuerpo que se observan como masas separadas que recubren la membrana basal del glomérulo después de la tinción inmunofluorescente con anti-IgG. Patrones similares se obtienen con un anticuerpo fluorescente anti-C3. (Cortesía de S. Thiru.)

transfusionales. Los eritrocitos recubiertos con estos anticuerpos tienen una semivida más corta, en gran parte por su adherencia a los macrófagos esplénicos. Mecanismos similares son los que causan la anemia en los pacientes con enfermedad por criohemaglutininas, quienes tienen anticuerpos monoclonales anti-1 tras la infección por *Mycoplasma pneumoniae,* y en algunos casos de criohemoglobinuria paroxística asociada con anticuerpos de Donath-Landsteiner activamente líticos, específicos del grupo sanguíneo P. Estos anticuerpos pertenecen sobre todo al isotipo IgM y sólo reaccionan bien a temperaturas por debajo de 37 °C. Los autoanticuerpos IgG contra las plaquetas causan la depleción de éstas en la **púrpura trombocitopénica idiopática**, principalmente a través de la depuración mediada por los receptores para Fcγ por los macrófagos tisulares del bazo y del hígado.

Los sueros de pacientes con tiroiditis de Hashimoto contienen anticuerpos que, en presencia de complemento, ejercen una acción citotóxica directa sobre las células tiroideas humanas aisladas en cultivo. En el síndrome de Goodpasture, los autoanticuerpos reconocen el colágeno de tipo IV de la membrana basal del glomérulo renal. Estos anticuerpos, junto con componentes del complemento, se unen a las membranas basales, donde la acción del sistema del complemento completo conduce a un daño grave (Figura 15.18a). Como ejemplo adicional de hipersensibilidad tipo II, se puede mencionar la destrucción de los receptores de acetilcolina de la placa neuromuscular por los autoanticuerpos en la miastenia grave.

Reacciones de tipo II a fármacos

Los fármacos pueden unirse a componentes corporales y sufrir la conversión de un hapteno a un antígeno completo, lo que puede inducir una respuesta inmunitaria en ciertos individuos. Si se producen anticuerpos IgE, éstos pueden causar reacciones anafilácticas. En algunas circunstancias, en particular con las pomadas aplicadas de manera tópica, se puede inducir una hipersensibilidad mediada por células. En otros casos en los que se produce el acoplamiento con las proteínas séricas puede darse la posibilidad de reacciones de tipo III mediadas por inmunocomplejos. En el contexto presente nos ocupamos de esos casos en los que el fármaco parece formar un complejo antigénico con la superficie de las células sanguíneas circulantes e induce la producción de anticuerpos que son citotóxicos para el complejo célula-fármaco. Cuando se suspende la administración del fármaco, la sensibilidad desaparece. Ejemplos de este mecanismo se observaron en la **anemia hemolítica** asociada con la administración continua de clorpromazina o fenacetina, en la **agranulocitosis** asociada con la ingestión de amidopirina o de quinidina, y la situación ahora clásica de la **púrpura trombocitopénica** que puede ser producida por sedormida, un sedante antiguo. En este último caso, el suero recién extraído del paciente lisará las plaquetas en presencia (pero no en ausencia) de sedormida; la inactivación del complemento por calentamiento del suero a 56 °C durante 30 minutos elimina este efecto.

Hipersensibilidad mediada por inmunocomplejos (tipo III)

En muchas circunstancias, el cuerpo puede estar expuesto a un exceso de antígeno durante un período prolongado: infecciones persistentes, autoinmunidad a los componentes propios y contacto repetido con agentes ambientales. La unión de estos antígenos y anticuerpos para formar un complejo dentro del organismo huésped puede dar lugar a reacciones inflamatorias agudas a través de diversos mecanismos (Figura 15.19). Para comenzar, los complejos pueden agregar las plaquetas con dos consecuencias: proporcionan una fuente de aminas vasoactivas y también pueden formar microtrombos que pueden conducir a la isquemia local (Figura 15.19a). Los inmunocomplejos también pueden estimular a los macrófagos a través de sus receptores Fcγ y generar la liberación de citocinas proinflamatorias IL-1

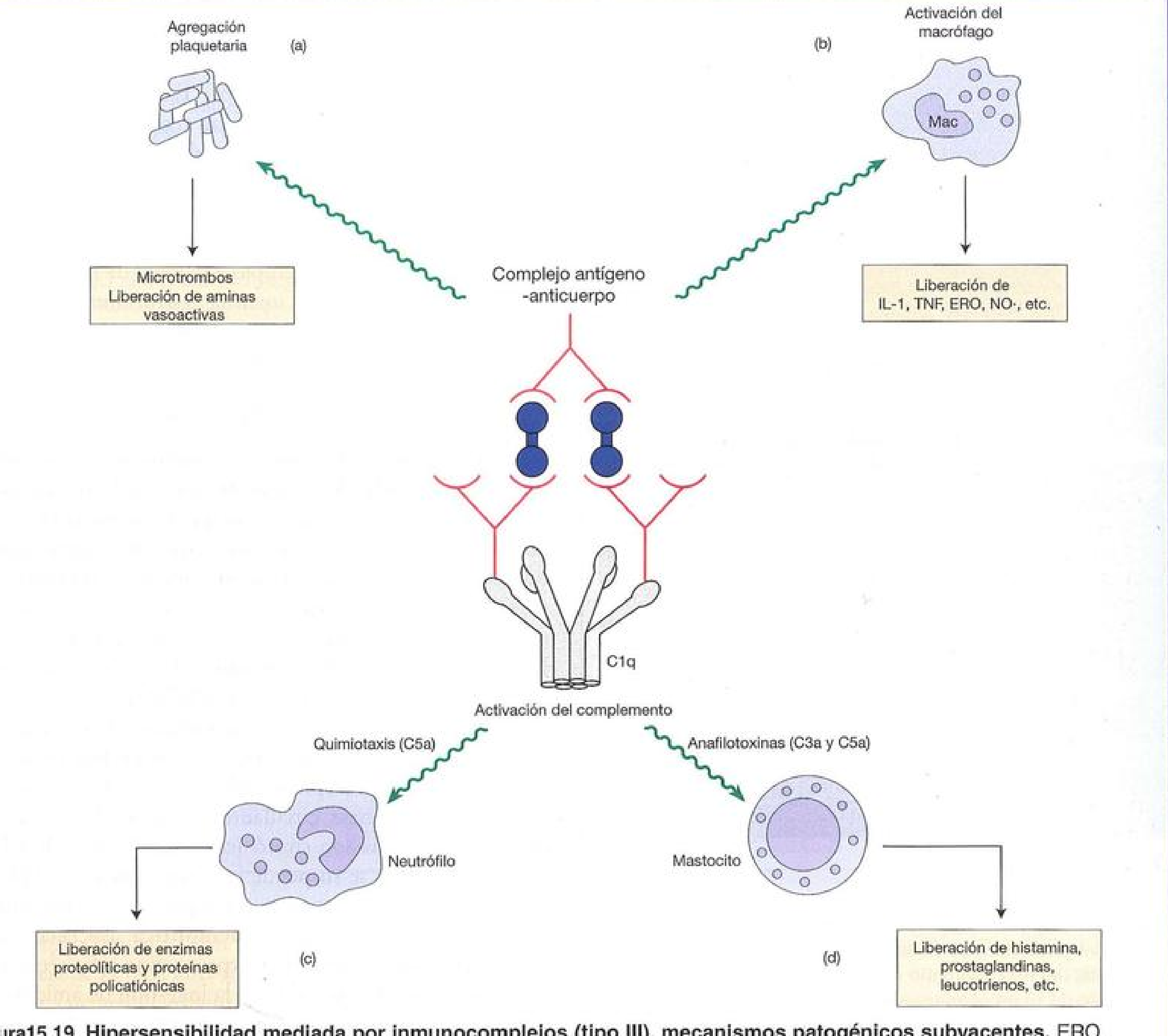
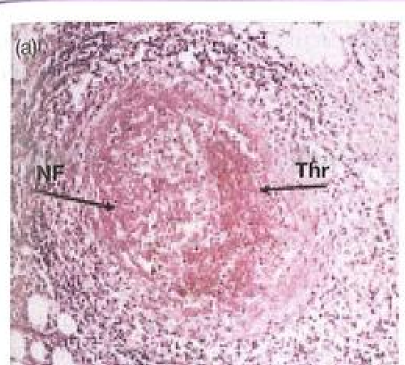


Figura15.19. Hipersensibilidad mediada por inmunocomplejos (tipo III), mecanismos patogénicos subyacentes. ERO, especies reactivas del oxígeno; NO• óxido nítrico.

y TNF, especies reactivas del oxígeno y óxido nítrico (Figura 15.19b). A menudo, los complejos que son insolubles no pueden ser digeridos después de la fagocitosis por los macrófagos y, en consecuencia, pueden proporcionar un estímulo de activación persistente. Si el complemento se fija, se libera el factor quimiotáctico C5a, que conduce al aflujo de neutrófilos (Figura 15.19c) y comienza la fagocitosis de los inmunocomplejos; a su vez, esto produce la liberación extracelular de los contenidos de los gránulos de los neutrófilos, en especial cuando el complejo se deposita sobre la membrana basal y no puede ser fagocitado (la denominada "fagocitosis frustrada"). Las enzimas proteolíticas (como las proteinasas neutras y las colagenasas), las enzimas formadoras de cininas, las proteínas policatiónicas y las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno liberadas causarán daño local de los tejidos e intensificarán las respuestas inflamatorias. Las anafilotoxinas C3a y C5a producidas tras la activación del complemento causarán la liberación de mediadores de los mastocitos y cambios en la permeabilidad vascular (Figura 15.19d). El daño adicional puede ser mediado por la lisis reactiva en la que los componentes C5, C6 y 67 activados se adhieren de manera accidental a la superficie de las células vecinas y se unen a C8 y C9. Dadas todas las consecuencias posibles de la formación de inmunocomplejos, es absolutamente clara la necesidad del sistema de inhibidores presente en el cuerpo.

El resultado de la formación de inmunocomplejos *in vivo* no sólo depende de las cantidades absolutas de antígeno y anticuerpo, que condicionan la intensidad de la reacción, sino también de sus proporciones *relativas,* que determinan la naturaleza de los complejos (véase la Figura 6.24) y su distribución dentro del organismo. Entre el **exceso de anticuerpo** y el **exceso leve de antígeno**, los complejos precipitan con rapidez y tienden a localizarse en el sitio de introducción del antígeno, mientras que con un **exceso moderado** o **importante del antígeno** se forman complejos solubles.

La unión covalente del C3b impide las interacciones Fc-Fc requeridas para formar los agregados insolubles de gran tamaño, y estos complejos pequeños se unen a los receptores CR1 para el complemento en el eritrocito humano y son transportados hacia los macrófagos fijos en el hígado donde,



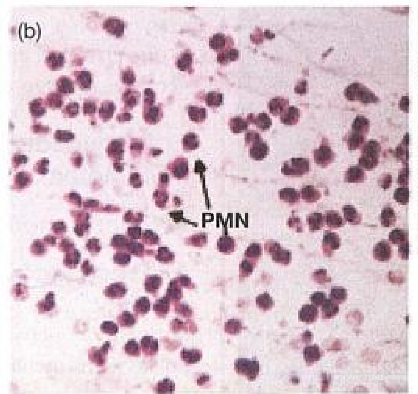




Figura 15.20. Histología de la reacción inflamatoria aguda en la poliarteritis nudosa asociada con la formación de inmunocomplejos con el antígeno de superficie (HBs) de la hepatitis B.

a) Un vaso sanguíneo que muestra la formación de un trombo (Thr) y necrosis fibrinoide (FN) está rodeado por un infiltrado inflamatorio mixto, en el que predominan los neutrófilos. b) Imagen con gran aumento de la respuesta inflamatoria aguda en el tejido conectivo laxo del paciente con poliarteritis nudosa; predominan los polimorfonucleares neutrófilos (PMN).
c) Estudios por inmunofluorescencia de los inmunocomplejos en la arteria renal de un paciente con infección crónica por virus de hepatitis B teñidos con anticuerpos marcados con fluoresceína contra el antígeno de hepatitis B *(izquierda)* y anti-IgM marcada con rodamina *(derecha)*. La presencia de antígeno y anticuerpos en la íntima y la media de la pared de la arteria indica el depósito de complejos en este sitio. Los depósitos de IgG y C3 también se detectan con la misma distribución. (Fotografías a y b cortesía de N. Woolf; c) cortesía de A. Nowoslowski.)

con seguridad, se tornan inactivos. Ésta es una función importante del eritrocito, una célula a menudo injustamente ignorada en el análisis del sistema inmunitario. Si hay defectos en este sistema, por ejemplo, deficiencias en los componentes de la vía clásica, o quizá si el sistema se encuentra sobrecargado, entonces puede producirse una enfermedad extensa con depósitos, que compromete los riñones, las articulaciones, la piel y el plexo coroideo (redes de capilares en las paredes de los ventrículos del cerebro).

Lesiones inflamatorias debidas a complejos formados localmente

Reacción de Arthus

Maurice Arthus encontró que la inyección intradérmica de antígeno soluble en conejos hiperinmunizados con concentraciones elevadas de anticuerpos precipitantes producía una reacción eritematosa y edematosa que alcanzaba su máxima expresión entre las 3-8 horas, que por lo común se resolvía más tarde. La lesión se caracterizaba por una infiltración intensa con neutrófilos (véase la Figura 15.20a y b). El antígeno inyectado precipita con el anticuerpo a menudo dentro de la vénula, con demasiada rapidez como para que el sistema clásico del complemento pueda evitarlo; en consecuencia, el complejo se une al complemento, y por medio de reactivos fluorescentes, puede demostrarse en esta lesión la presencia conjunta de antígeno, inmunoglobulina y componentes del complemento, como se ilustra en la respuesta inflamatoria contra depósitos de inmunocomplejos que contienen antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en un paciente con periarteritis nudosa (Figura 15.20c). También participan la producción de anafilotoxina, la desgranulación de los mastocitos, la activación de macrófagos, la agregación de plaquetas y el aflujo de neutrófilos. La reacción de Arthus puede ser atenuada mediante la depleción de neutrófilos por mostaza nitrogenada o del complemento con el empleo de anti-C5a; las formas solubles de las proteínas reguladoras del complemento CD46 (proteína cofactor de membrana) y CD55 (factor de retraso de la aceleración) también son inhibidoras.

Reacciones a antígenos inhalados

Las **reacciones intrapulmonares de tipo Arthus** a antígenos inhalados exógenos parecen causar diversos trastornos de hipersensibilidad en los seres humanos. Las dificultades respiratorias graves asociadas con el **pulmón del granjero** aparecen dentro de las 6-8 horas de exposición al polvo del moho del heno. Los pacientes se encuentran sensibilizados a los actinomicetos termófilos que crecen en el heno mohoso, y los extractos de estos microorganismos dan reacciones de precipitación con el suero del paciente y reacciones de Arthus con la inyección intradérmica. La inhalación de esporas bacterianas presentes en el polvo de heno introduce el antígeno en los pulmones y se desencadena una reacción de hipersensibilidad mediada por complejos. Situaciones similares suceden en la enfermedad de los criadores de palomas en la que el antígeno es la proteína sérica que se halla en el polvo seco de las heces, y en muchos otros casos de **alveolitis alérgica extrínseca** de nombres extravagantes que son el resultado de la inhalación continua de partículas orgánicas, por ejemplo la enfermedad del lavador de quesos (*esporas de Penicillium casei*), el pulmón del peletero (proteínas de la piel de zorro) y la enfermedad del descortezador de arces (esporas de *Cryptostroma)*. Las pruebas de que una respuesta anafiláctica inmediata de tipo I pueden ser importantes en algunas oportunidades para la iniciación de una reac-



Figura 15.21. Eritema nudoso leproso, antebrazo.

El paciente sufre lepra lepromatosa con un eritema nudoso sobreagregado. Estos nódulos inflamados de modo agudo eran extremadamente dolorosos y el paciente presentaba fiebre. (Fotografía amablemente proporcionada por G. Levene.)

ción de Arthus provienen de los estudios de pacientes con aspergilosis broncopulmonar alérgica que presentan concentraciones elevadas de anticuerpos IgE y precipitantes IgG contra las especies de *Aspergillus*.

Reacciones a antígenos internos

A menudo, las reacciones de tipo III son provocadas por la liberación local de antígenos provenientes de microorganismos infecciosos dentro del cuerpo; por ejemplo, los helmintos filariformes viables, como el *Wuchereria bancrofti*, son relativamente inocuos, pero el parásito muerto en los vasos linfáticos inicia una reacción inflamatoria que causa la obstrucción del flujo linfático, y si continúa, una elefantiasis monstruosa. La muerte celular microbiana que tiene lugar después de la quimioterapia puede causar una liberación abrupta de antígenos microbianos, y en individuos con concentraciones elevadas de anticuerpos causa reacciones mediadas por inmunocomplejos espectaculares, como **eritema nudoso leproso** en la piel de pacientes afectados de lepra lepromatosa tratados con dapsona (Figura 15.21) y la reacción de Jarisch-Herxheimer en pacientes sifilíticos tratados con penicilina.

Una variante interesante de la reacción de Arthus se observa en la artritis, en la cual se forman complejos locales en la articulación como consecuencia de la producción de IgG anti-IgG autoasociadas por los plasmocitos sinoviales.

Los complejos también podrían generarse en un sitio local por un mecanismo bastante diferente que implica la adherencia inespecífica de un antígeno a las estructuras tisulares, seguida por la unión de anticuerpos solubles; en otras palabras, el antígeno se fija al tejido *antes* y no *después* de la combinación con el anticuerpo. Aunque no está claro hasta qué punto actúa ese mecanismo en los pacientes con enfermedad por inmunocomplejos, describiremos la observación experimental en la que se basa. Después de la inyección de endotoxina bacteriana, los ratones liberan DNA dentro de la circulación que se une de manera específica al colágeno en la membrana basal de los capilares glomerulares; la endotoxina también ocasiona la activación policlonal de las células B que elaboran anti-DNA, la cual da lugar a complejos antígeno-anticuerpo en el riñón.

Enfermedades producidas por complejos circulantes

Glomerulonefritis por inmunocomplejos

El depósito de complejos es un proceso dinámico, y la enfermedad de larga evolución sólo se observa cuando el antígeno es persistente, como en las infecciones crónicas y en las enfermedades autoinmunitarias. En los glomérulos, los **complejos más pequeños alcanzan el lado epitelial**; pero en forma progresiva, los **complejos cada vez más grandes son retenidos en el lado endotelial de la membrana basal del glomérulo o sobre ésta** (Figura 15.22). Se acumulan como gránulos "abultados" cuyos componentes de antígeno, inmunoglobulina y complemento (C3) se tiñen por inmunofluorescencia (Figura 15.18b), y aparecen como masas amorfas grandes en los estudios por microscopia electrónica (véase la Figura 18.18). El proceso inflamatorio daña la membrana basal cuando el complejo ocupa los receptores Fcγ de las células efectoras, como reveló la ausencia de glomerulonefritis a pesar del depósito de inmunocomplejos en los riñones de ratones híbridos F1 Nueva Zelandia (B × W) que sufrieron desactivación génica de FcγR (modelo murino del lupus eritematoso sistémico humano, LES). La proteinuria es el resultado de la pérdida de proteínas séricas a través de la membrana dañada, y la albúmina sérica, que es pequeña, aparece en la orina incluso con grados menores de lesión glomerular (Figura 15.23, columna 3).

Muchos casos de glomerulonefritis se asocian con complejos circulantes, y las biopsias brindan un patrón de tinción fluorescente similar al de la Figura 15.18b, que representa los depósitos DNA/anti-DNA/complemento en el riñón de un paciente con LES. Es bien conocida la enfermedad que puede seguir a la infección por ciertas cepas de los denominados "estreptococos nefritógenos" y el síndrome nefrótico asociado con el paludismo, en el cual participarían complejos con los antígenos del microorganismo infectante. La nefritis por inmunocomplejos puede originarse en el curso de infecciones virales crónicas, como se observó en individuos coinfectados por HIV y virus de la hepatitis C.

Depósito de inmunocomplejos en otros sitios

El plexo coroideo del cerebro constituye un sitio importante de filtración y, por consiguiente, también se ve afectado por el depósito de inmunocomplejos. Esto justificaría la frecuencia de los trastornos nerviosos centrales en el LES. Los pacientes con afección neurológica tienen tendencia a concentraciones disminuidas de C4 en el líquido cefalorraquídeo (LCR), y en exámenes post mórtem se demostró que los pacientes con LES y trastornos neurológicos con altos títulos de anticuerpos anti-DNA presentaban depósitos diseminados de inmunoglobulina y DNA en el plexo coroideo. La panenecefalitis esclerosante subaguda se asocia con una relación alta de anticuerpos contra el sarampión entre el

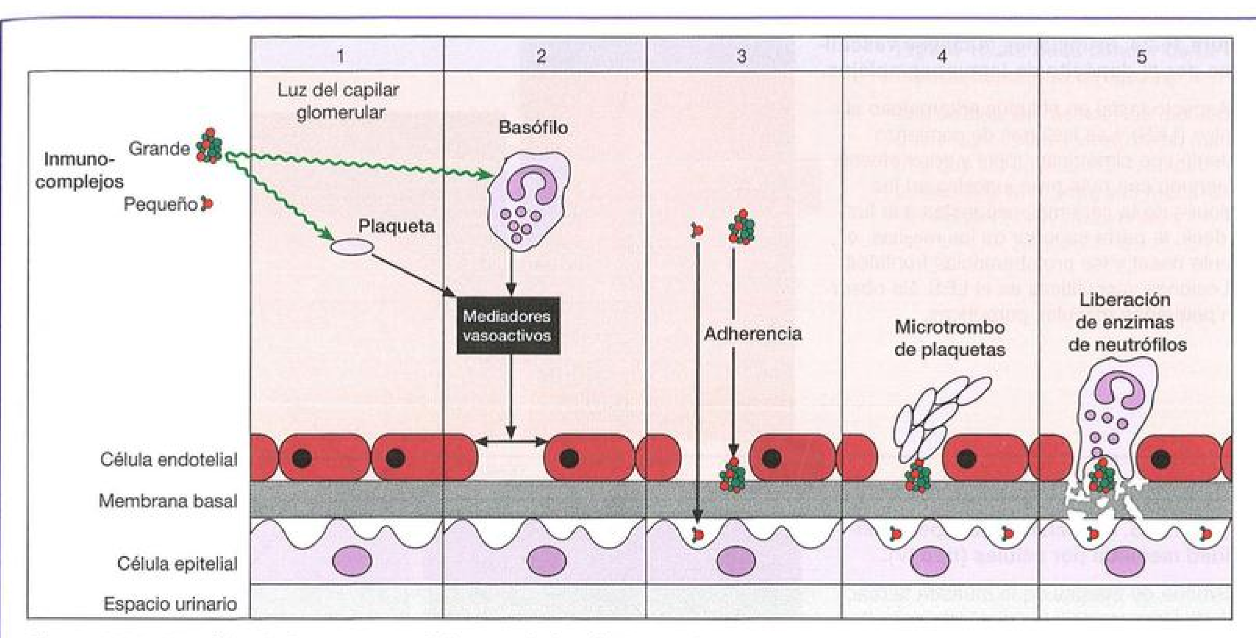


Figura 15.22. Depósito de inmunocomplejos en el glomérulo renal.

(1) Los complejos inducen la liberación de mediadores vasoactivos a partir de los basófilos y las plaquetas, que causan (2) la separación de las células endoteliales. (3) Adherencia de complejos más grandes a la membrana basal expuesta, con complejos más pequeños que pasan hacia el lado epitelial. (4) Los complejos inducen la agregación plaquetaria. (5) Los neutrófilos atraídos por quimiotaxis liberan el contenido de los gránulos en una "fagocitosis frustrada" para dañar la membrana basal y producen la filtración de proteínas séricas. El depósito de complejos es favorecido en el capilar glomerular porque es el sitio principal de filtración y tiene una alta presión hidrodinámica. El depósito está muy reducido en los animales con disminución de plaquetas o tratados con antagonistas de aminas vasoactivas.

LCR y el suero, y pueden encontrarse depósitos que contienen inmunoglobulina y antígeno del sarampión en el tejido nervioso.

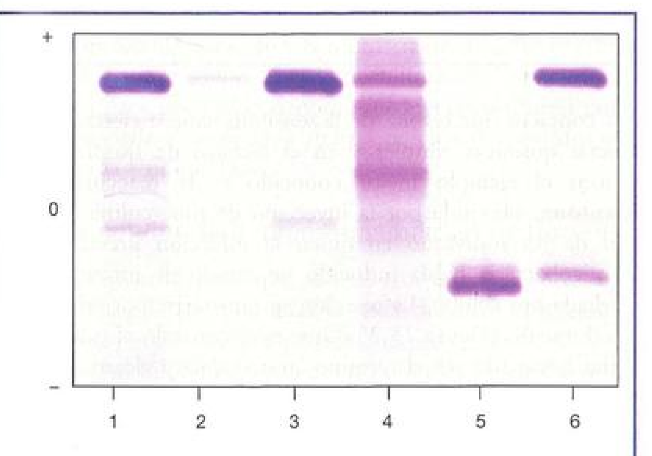


Figura 15.23. Proteinuria demostrada por electroforesis.

Columna 1: Suero normal para usar como referencia. La banda mayor más cerca del cátodo corresponde a la albúmina. Columna 2: Orina normal que muestra trazas de albúmina. Columna 3: Proteinuria glomerular que muestra un componente importante de albúmina. Columna 4: Proteinuria que resulta del daño tubular con un patrón electroforético totalmente diferente. Columna 5: Proteinuria de Bence Jones que representa las cadenas ligeras de paraproteína excretada. Columna 6: Proteinuria de Bence Jones con vestigios de paraproteína intacta. Algunas de las muestras fueron concentradas. (Electroforogramas proporcionados por T. Heys.)

Las erupciones vasculíticas cutáneas también son características del lupus eritematoso sistémico y del lupus discoide (Figura 15.24); las biopsias de las lesiones revelan depósitos amorfos de inmunoglobulina y C3 en la membrana basal de la unión dermoepidérmica (véase la Figura 18.19).

Otro ejemplo de hipersensibilidad por inmunocomplejos es el síndrome de shock hemorrágico, que se observa con cierta frecuencia en el sudeste de Asia durante una segunda infección por el virus del dengue. Hay cuatro tipos de virus, y los anticuerpos contra un tipo producido durante una primera infección pueden no neutralizar una segunda cepa y en cambio facilitar su entrada en los monocitos humanos y la replicación dentro de éstos por la adherencia del complejo a los receptores Fc. El incremento en la producción del virus conduce a la formación de inmunocomplejos y una activación intravascular masiva de la vía clásica del complemento. En algunos casos, fármacos como la penicilina se tornan antigénicos después de la unión con proteínas corporales y forman complejos que median las reacciones de hipersensibilidad.

Debe aclararse que la persistencia de complejos circulantes no siempre conduce a hipersensibilidad de tipo III (p. ej., en muchos pacientes con cáncer y en individuos con reacciones idiotipo-antiidiotipo). Tal vez en estos casos los complejos carecen de la capacidad de iniciar los cambios requeridos para el depósito de los complejos, pero algunos autores sostienen que los complejos detectados en el suero pueden a veces ser artificios que se liberan a partir de su adherencia *in vivo* a los receptores CR1 del eritrocito por la acción del factor 1 durante el procesamiento de la sangre.

Figura 15.24. Erupciones cutáneas vasculíticas por el depósito de inmunocomplejos.

a) Aspecto facial en el lupus eritematoso sistémico (LES). Las lesiones de comienzo reciente son simétricas, rojas y edematosas. A menudo son más pronunciadas en las regiones de la cara más expuestas a la luz, es decir, la parte superior de las mejillas, el puente nasal y las protuberancias frontales. b) Lesiones vasculíticas en el LES. Se observan pequeñas máculas purpúricas.



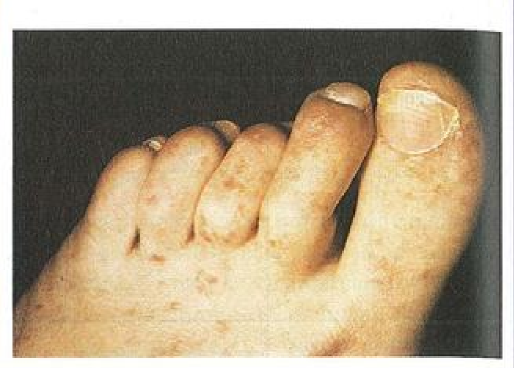
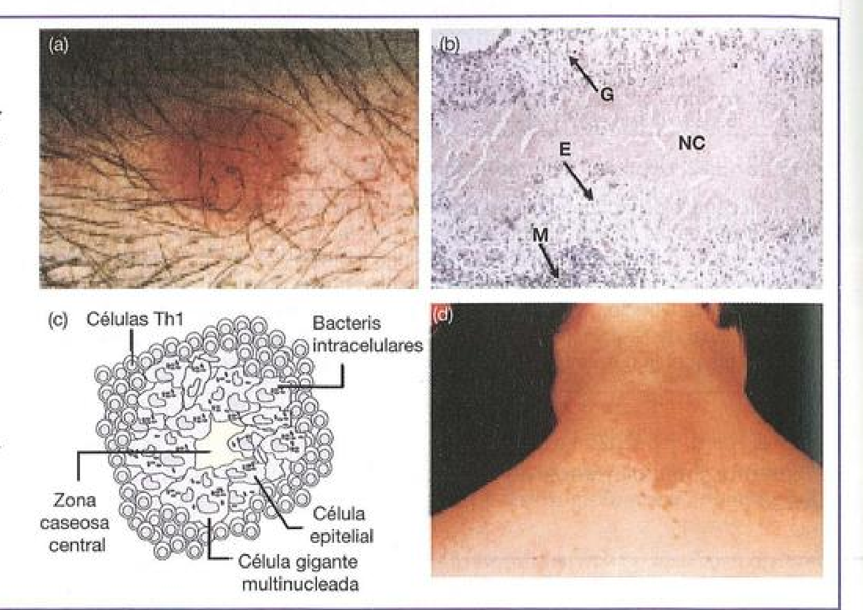


Figura 15.25. Reacciones de hipersensibilidad mediada por células (tipo IV).

a) Prueba de Mantoux que muestra la reacción de hipersensibilidad mediada por células a la tuberculina, caracterizada por induración y eritema. b) Lesión inflamatoria crónica de tipo IV en el pulmón tuberculoso, que muestra necrosis caseosa (NC), células epitelioides (E), células gigantes (G) y células inflamatorias mononucleares (M). c) Representación esquemática de un granuloma con necrosis caseosa central. (d) Reacción de hipersensibilidad por contacto de tipo IV al níquel causada por el broche de un collar. a) Cortesía de J. Brostoff, y b) de R. Barnetson; d) reproducida de las diapositivas para enseñanza de la British Society for Immunology con autorización de la Sociedad y el Departamento de Dermatología, London Hospital.)



Tratamiento

Evitar los antígenos exógenos inhalados que inducen las reacciones de tipo III es obvio. La eliminación de microorganismos asociados con la enfermedad por inmunocomplejos mediante quimioterapia puede provocar una reacción adicional como consecuencia de la liberación copiosa de antígeno. La supresión de los factores accesorios que se consideran necesarios para el depósito de complejos parece lógica. A menudo se utilizan el cromoglicato de sodio, la heparina y los salicilatos; estos últimos son estabilizadores plaquetarios eficaces, así como potentes agentes antiinflamatorios. Los corticosteroides son inhibidores particularmente poderosos de la inflamación y son inmunosupresores. En muchos casos, en particular en los que participa la autoinmunidad, puede estar justificado el uso de agentes inmunosupresores convencionales.

Hipersensibilidad mediada por células (retardada; tipo IV)

La hipersensibilidad retardada se observa en muchas reacciones alérgicas contra agentes infecciosos, en la dermatitis por contacto que resulta de la sensibilización a ciertas sustancias químicas simples y en el rechazo de trasplantes. Quizás el ejemplo mejor conocido es la **reacción de Mantoux,** obtenida por la inyección de tuberculina en la piel de un individuo en quien la infección previa con la micobacteria había inducido un estado de inmunidad mediada por células. La reacción se caracteriza por eritema e induración (Figura 15.25a) que aparecen sólo al cabo de varias horas (de ahí el término "retardada") y alcanzan un máximo a las 24-48 horas, para atenuarse después. Desde el punto de vista histológico, la fase más temprana de la reacción se presenta como un manguito perivascular con células mononucleares, y es seguida por un exudado más amplio de células mononucleares y polimorfonucleares. Éstas migran rápidamente fuera de la lesión y dejan un infiltrado con predominio de células mononucleares, constituido por linfocitos y células de la serie monocitos-macrófagos (Figura 15.25b), lo cual contrasta con el carácter esencialmente "neutrófilo" de la reacción de Arthus (Figura 15.20b).

Se obtienen reacciones comparables contra proteínas solubles cuando la sensibilización es inducida por la incorporación del antígeno al adyuvante completo de Freund. En algunos casos, pero no en todos, si los animales son sensibi-

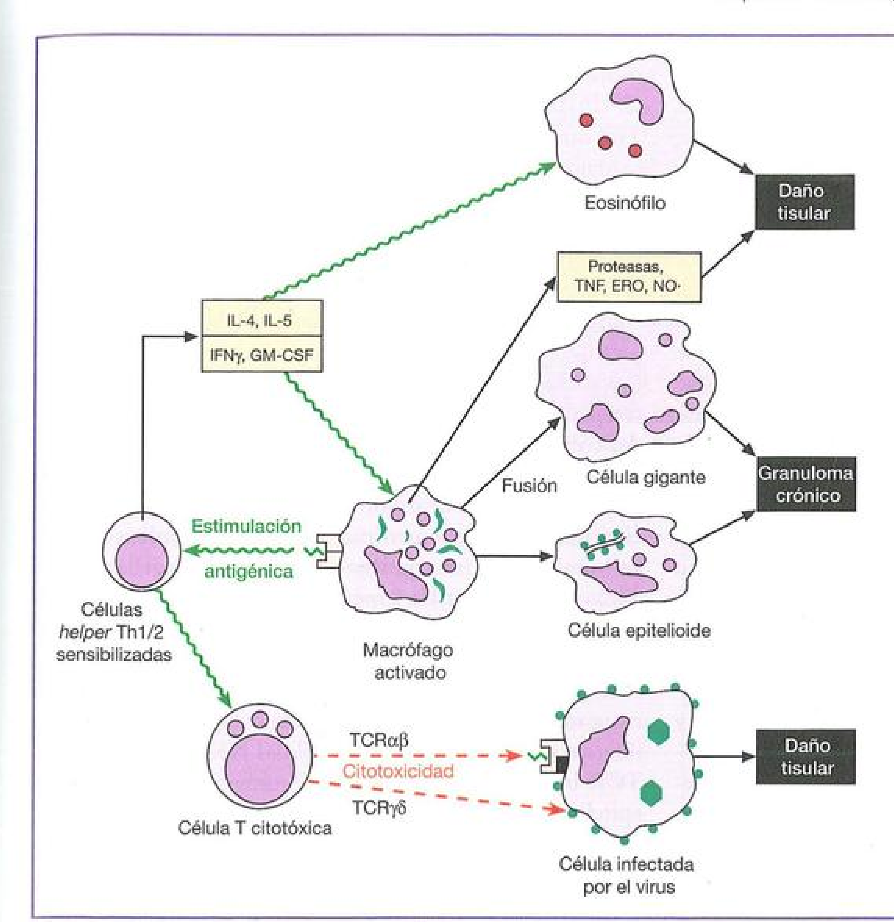


Figura 15.26. Base celular de la hipersensibilidad de tipo IV.

Las células Th1 activan los macrófagos y las células T citotóxicas, mientras que las células Th2 reclutan eosinófilos. ERI, especies reactivas del oxígeno; NO• óxido nítrico.

lizados con el antígeno solo o en un adyuvante incompleto de Freund (que carece de las micobacterias presentes en el adyuvante completo), el estado de hipersensibilidad retardada es de menor duración y la respuesta dérmica es más transitoria. Esto se conoce como sensibilidad de "Jones-Mote", si bien hace poco se la denominó **hipersensibilidad cutánea basófila** a causa de la alta proporción de basófilos que infiltra la lesión cutánea.

Base celular de la hipersensibilidad de tipo IV

A diferencia de lo que sucede con las otras formas de hipersensibilidad ya tratadas, la reactividad del tipo retardada no se puede transferir por anticuerpos séricos de un individuo sensibilizado a otro no sensibilizado; se requieren linfocitos T. Cabe destacar que con frecuencia la lesión de hipersensibilidad es el resultado de una interacción exagerada entre el antígeno y los mecanismos inmunitarios *normales* mediados por células. Tras la sensibilización inicial, las células T de memoria reconocen el péptido antigénico junto con las moléculas de clase II del CMH sobre una célula presentadora de antígeno y son estimuladas para sufrir proliferación. Las células T estimuladas liberan varias citocinas que actúan como mediadores de la respuesta de hipersensibilidad resultante, en particular mediante la atracción y la activación de los macrófagos si aquéllas pertenecen a la subpoblación de Th1, o de los eosinófilos si son Th2. Las células T *helper* también colaboran con los precursores de Tc para que se transformen en células *killer*, que pueden causar daño a las células diana infectadas por virus (Figura 15.26), las células T citotóxicas CD8 TCRαβ que son activadas por el reconocimiento de complejos de clase I del CMH con las proteínas virales procesadas y killer TCRγδ que actúan a través de la unión a las proteínas virales nativas sobre la superficie de las células infectadas. También se consideró que participan las células Th17. Así, los ratones con desactivación génica para IL-17 tienen respuestas de hipersensibilidad retardada deterioradas, y la IL-17 es secretada por clones de células T específicas para el níquel con antígeno linfocítico cutáneo (CLA)$^+$ provenientes de pacientes alérgicos contra este alérgeno. Las citocinas liberadas por las células Th1 y Th17 causan la activación de las células NK que entonces liberan citocinas proinflamatorias y ejercen su actividad destructora al inducir la apoptosis en los queratinocitos. Se sabe que la IL-17 ejerce un efecto sinérgico con el IFNγ para aumentar la expresión de ICAM-1 y la producción de quimiocina por los queratinocitos humanos, que pueden acelerar su desaparición.

Daño tisular producido por las reacciones de tipo IV

Infecciones

El desarrollo de un estado de hipersensibilidad mediada por células contra los productos bacterianos es probablemente el causante de las lesiones como la cavitación, la caseificación y la toxemia general vistas en la tuberculosis

humana y en las lesiones cutáneas granulomatosas de los pacientes con lepra dimorfa. Cuando la batalla entre las bacterias que se encuentran en fase de multiplicación y las defensas del cuerpo no se resuelve a favor del huésped, el antígeno que persiste provoca una reacción de hipersensibilidad retardada local crónica. La liberación incesante de citocinas a partir de los linfocitos T sensibilizados lleva a la acumulación de grandes cantidades de macrófagos, muchos de los cuales dan lugar a las series de células epitelioides (macrófagos que se asemejan en cuanto a sus características morfológicas a las células epiteliales), mientras que otros se fusionan formando células gigantes. Los macrófagos que presentan péptidos provenientes de los antígenos bacterianos por medio de sus moléculas de clase I del CMH de superficie pueden convertirse en diana para las células T citotóxicas y ser destruidos. Se producirá un daño tisular adicional como resultado de la citotoxicidad indiscriminada por los macrófagos activados por citocinas. Desde el punto de vista morfológico, esta combinación de tipos celulares con linfocitos y fibroblastos en proliferación asociados con áreas de fibrosis y necrosis se denomina **granuloma crónico**, y representa el intento del organismo huésped de bloquear un sitio de infección persistente (Figuras 15.25b, c y 15.26). Debe advertirse que los granulomas también se pueden originar a partir de la persistencia de complejos antígeno-anticuerpo indigeribles o de material inorgánico, como el talco, dentro de los macrófagos, aunque los granulomas de origen no inmunitario pueden ser distinguidos por la ausencia de linfocitos.

Las erupciones cutáneas en el sarampión y las lesiones asociadas con la infección por herpes simple pueden atribuirse en gran medida a reacciones de tipo retardado con daño extenso mediado por Tc a las células infectadas por el virus. De igual modo, las células T citotóxicas específicas pueden causar destrucción extensa de los hepatocitos infectados por el virus de la hepatitis B. La hipersensibilidad mediada por células se demostró también en enfermedades micóticas como la candidiasis, la dermatomicosis, la coccidioidomicosis y la histoplasmosis, y en la enfermedad parasitaria leishmaniasis.

La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa son las dos formas principales de la **enfermedad inflamatoria intestinal (EII)** y constituyen entidades separadas, aunque es probable que ambas sean el resultado de la falta de regulación de las respuestas inmunitarias de la mucosa intestinal contra antígenos microbianos. La **enfermedad de Crohn** se caracteriza por la inflamación granulomatosa transmural que afecta la totalidad de la pared intestinal desde la mucosa hasta la serosa y la formación de fibrosis, microperforaciones y fístulas. La inflamación puede comprometer todo el tubo digestivo. Por el contrario, en la **colitis ulcerosa** hay una inflamación más superficial limitada al colon y al recto. Las mutaciones en el gen *NOD2*, que codifica un receptor de reconocimiento de patrón citoplasmático para el dipéptido muramil del peptidoglucano de la pared celular bacteriana, están fuertemente asociadas con la susceptibilidad de la enfermedad de Crohn. La EII puede ser inducida en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (IDCG) por la transferencia de células T CD4 (vírgenes) $CD45RB^{hi}$, pero la colitis que se desarrolla es resuelta con la transferencia posterior de $CD4^{+}$, $CD25^{+}$, células T reguladoras $CD45RB^{lo}$. Las células agresoras pertenecen a la población Th1 dirigidas por IL-12 que producen TNF e IFNγ, extremadamente tóxicos para los enterocitos, mientras las células reguladoras secretan las citocinas supresoras TGFβ e IL-10. El anticuerpo monoclonal anti-TNF es una terapéutica muy eficaz; el tratamiento prebiótico con lactobacilos y *Streptococcus salivarius* parece mantener la remisión en la colitis grave, es menos draconiano y más accesible para el presupuesto (recuérdense los simpáticos anuncios publicitarios de los yogures). Se están llevando a cabo ensayos clínicos para establecer la eficacia de estos tratamientos en grandes cohortes de pacientes.

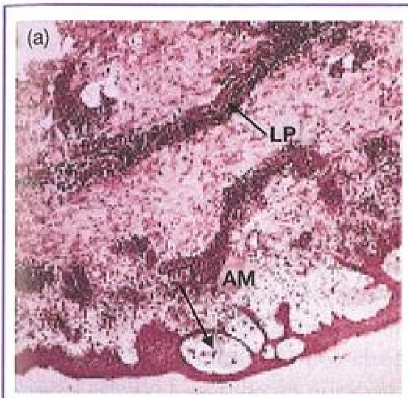
La colitis experimental inducida en ratones SJL/J por la administración de oxazolona se presenta como una inflamación relativamente superficial semejante a la **colitis ulcerosa** humana. En un comienzo está mediada por las células Th2 que producen IL-4, pero rápidamente se produce una respuesta atípica de Th2 que incluye a las células NKT productoras de IL-13. También se observó que el tejido inflamado en pacientes con colitis ulcerosa contiene cantidades mayores de células NKT no clásicas que producen IL-13 (a diferencia de la mayoría de las células NKT, éstas no tienen TCR invariables) y pueden ser citotóxicas para las células epiteliales humanas.

Sarcoidosis

La sarcoidosis es una enfermedad de etiología desconocida que afecta el tejido linfoide e implica la formación de granulomas crónicos. Se considera que puede ser causada por una respuesta inflamatoria crónica mediada por células Th1 contra un agente infeccioso o ambiental o un autoantígeno. A menudo hay un aumento de células B activadas y una hipergammaglobulinemia. Se obtuvieron pruebas con micobacterias atípicas, pero hay una depresión en la hipersensibilidad de tipo retardado y los pacientes son anérgicos en las pruebas cutáneas con tuberculina, tal vez debido a la presencia cantidades mayores de células T reguladoras $CD4^{+}CD25^{+}$ en los pacientes con enfermedad activa. Los pacientes desarrollan una reacción granulomatosa algunas semanas después de la inyección intradérmica de extractos de bazo provenientes de otro paciente con sarcoidosis; es la denominada **reacción de Kveim**.

Dermatitis por contacto

La vía de inoculación epidérmica tiende a favorecer el desarrollo de una respuesta de células Th1 a través del procesamiento por las células dendríticas de Langerhans con alto contenido de moléculas de clase II (véase la Figura 2-7f), que migran a los ganglios linfáticos y presentan el antígeno a los linfocitos T. Así, las reacciones retardadas en la piel a menudo son producidas por sustancias extrañas de bajo peso molecular capaces de unirse a péptidos dentro de la hendidura de las moléculas del CMH en la superficie de las células de Langerhans para formar nuevos antígenos. Las reacciones se caracterizan por un infiltrado de células mononucleares que alcanza su máximo a las 12-15 horas, acom-



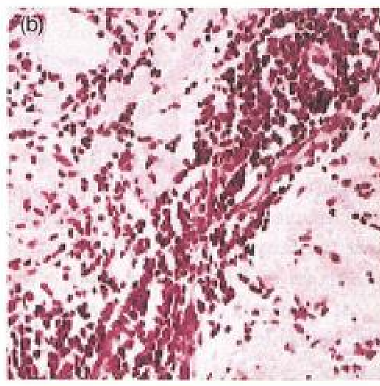


Figura 15.27. Sensibilidad por contacto.

a) Los infiltrados linfocíticos perivasculares (LP) y la formación de ampollas (AM) caracterizan a la reacción de sensibilidad por contacto de la piel. b) Imagen con mayor aumento que pone de manifiesto la naturaleza del infiltrado linfocítico en una reacción de hipersensibilidad por contacto. (Cortesía del N. Woolf.)

pañado de edema de la epidermis con formación de microvesículas (Figura 15.27). Sin embargo, en esta historia hay un aspecto más raro, debido tal vez a que el reactivo desencadenante es un hapteno. La reacción mononuclear tardía depende totalmente de fenómenos muy tempranos (1-2 horas) mediados por IgM específica para el hapteno producida por células B-1, que junto con el complemento activa los vasos sanguíneos locales para permitir el reclutamiento de células T. La hipersensibilidad por contacto puede aparecer en personas que se sensibilizan cuando trabajan con sustancias químicas, como el cloruro de picrilo y los cromatos, o que de manera repetida entran en contacto con la sustancia urusiol de la hiedra venenosa. La *p*-fenilendiamina en ciertas tinturas capilares, la neomicina en las pomadas de aplicación tópica y las sales de níquel que se forman a partir del contacto con artículos como los broches de níquel de los collares (Figura 15.25d) pueden provocar reacciones similares. Ante la estimulación antigénica, los clones de células T específicos para las sales de níquel aisladas de este último grupo produce un perfil de citocinas de tipo Th1 (IFNγ, IL-2) (Figura 15.10b). Las células NKT invariables que producen la citocina IFNγ "Th1" y la citocina IL-4 "Th2" también están presentes en el infiltrado cutáneo de los pacientes con dermatitis por contacto.



Figura 15.28. Respuesta mediada por Th2 contra huevos de esquistosoma.

Lesión de hipersensibilidad de tipo Th2 de células inflamatorias (M) alrededor de un huevo de esquistosoma (HE) dentro del parénquima hepático (PH). (Cortesía de M. Doenhoff.)

Otros ejemplos

Las respuestas excesivas de las células Th2 pueden dañar tejidos a través de la activación de eosinófilos (Figura 15.26). Como se mencionó antes, las células T que sintetizan IL-5 son, en gran medida, las que determinan el aflujo sostenido de eosinófilos en el asma y la dermatitis. Asimismo, las células Th2 también son responsables de la patología en la esquistosomiasis, que ha sido atribuida a la reacción contra enzimas solubles provenientes de los huevos del parásito que hacen eclosión en los capilares (Figura 15.28).

Se ha sugerido que la respuesta de hipersensibilidad retardada relativamente mixta Th1-Th2, inducida por la picadura de insectos hematófagos como el mosquito flebótomo *(Phlebotomus papatasi)*, podría representar una adaptación del insecto para dirigir la respuesta inmunitaria del huésped en su propio beneficio. Así se demostró que el aumento del flujo sanguíneo asociado con los sitios de hipersensibilidad retardada permitía que el mosquito flebótomo se alimentara con una velocidad dos veces mayor que en piel indemne.

La contribución de las reacciones de hipersensibilidad retardada en el rechazo de injertos se trata en el Capítulo 16 y la posible función de las células Tc para el control de las células neoplásicas, en el Capítulo 17. En ciertas enfermedades autoinmunitarias organoespecíficas, como la diabetes tipo I, las reacciones de hipersensibilidad mediadas por células proporcionan, sin duda, el principal instrumento para la destrucción tisular.

La inflamación intestinal en la **enfermedad celíaca**, una enteropatía asociada con HLA-DQ2/8, es precipitada por la exposición a la gliadina del trigo de la dieta. El trastorno comprende lo que tal vez sea un aumento genéticamente relacionado de la actividad de la transglutaminasa (el antígeno diana de los autoanticuerpos antiendomisio) de la mucosa. Esta enzima desamida los residuos glutamina de la gliadina y crea un nuevo epítopo de la célula T que se une eficazmente a DQ2 y es reconocido por las células Th1 $CD4^+$ intraepiteliales que secretan IFNγ. La producción local de IL-15 también participa al aumentar la expresión de las moléculas no clásicas de clase I del CMH como MICA sobre las células epiteliales y los receptores para éstas como

NKG2D sobre las células T CD8+ αβ, células T γδ y células NK, lo cual lleva a la destrucción citotóxica de las células epiteliales.

La **psoriasis** implica una proliferación marcada de queratinocitos de la epidermis y una acelerada diferenciación epidérmica incompleta. Por razones aún no aclaradas, en alrededor del 10% de los pacientes las manifestaciones cutáneas se asocian con artritis psoriásica que implica la inflamación y la destrucción articulares. La inflamación de la piel comprende neutrófilos y células T CD4 y CD8 que son CD45RO+, lo cual indica que ya han estado expuestos al antígeno. La liberación de IFNγ induce hiperplasia epidérmica y, junto con el TNF, aumenta la expresión de ICAM-1 sobre los queratinocitos de la epidermis, que por ello facilita la adhesión de células T. Los experimentos en un modelo de xenoinjerto de piel psoriásica, que consistieron en el trasplante de piel humana en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (IDCG), permitieron identificar que la forma activada de la molécula de señalización celular que actúa como transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3) se localiza sobre el núcleo de los queratinocitos epidérmicos tras la transferencia de células T CD4 pero no CD8; esto pone de manifiesto el papel central de la señalización STAT3 en las interacciones entre las células CD4 activadas y los queratinocitos. Los agentes biológicos que son eficaces en el tratamiento de la psoriasis incluyen el etanercept (proteína de fusión IgG con el receptor para TNF) y los anticuerpos monoclonales adalimumab (anti-TNF humano), infiximab (anti-TNF quimérico) y ustekinumab (anti-IL-12 e IL-23 humano). El efalizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 contra CD11a (LFA-1), también es eficaz, pero se ha retirado debido a cuestiones de seguridad. Recientemente se demostró que la producción de IL-22 por las células Th17 media en la proliferación de queratinocitos y la hiperplasia de las células epidérmicas, lo que proporciona otro posible agente terapéutico.

Un agregado a la clasificación original: hipersensibilidad estimuladora ("tipo V")

Si bien Gell y Coombs sólo incluyeron cuatro tipos de reacciones de hipersensibilidad en su clasificación, algunas veces se agrega una quinta reacción (tipo V). Esta sucede cuando un anticuerpo contra el receptor de la superficie celular actúa como agonista y conduce a la estimulación de la célula. Cuando la hormona tirotropina (TSH) se une a su receptor tiroideo de las células epiteliales, la adenilciclasa es activada y el "segundo mensajero" cAMP generado actúa para estimular la producción de la hormona tiroidea. Una vez que se producen concentraciones suficientes de las hormonas, el circuito de retroalimentación negativa interrumpe la producción de TSH. Los **anticuerpos tiroideos estimulantes** presentes en pacientes con enfermedad de Graves están dirigidos contra el receptor TSH y mimetizan el efecto de TSH, salvo que en este caso la secreción continua de autoanticuerpos por los plasmocitos lleva a una estimulación constante de la glándula tiroides que conduce al hipertiroidismo. En pacientes con preeclampsia y con hipertensión se describieron autoanticuerpos agonistas que estimulan el receptor AT1 para angiotensina II.

Reacciones de hipersensibilidad "innata"

Muchas infecciones dan lugar a un **"síndrome de shock tóxico"** que se caracteriza por hipotensión, hipoxia, oliguria y anormalidades microvasculares, y es mediado por elementos del sistema inmunitario innato independientemente de la acción de las respuestas inmunitarias adquiridas.

La septicemia asociada con las **bacterias gramnegativas** da por resultado la liberación excesiva de TNF, IL-1 e IL-6 a través de la estimulación de macrófagos y células endoteliales por una endotoxina lipopolisacárido. Normalmente esto reforzaría las defensas del huésped porque contribuye al reclutamiento de fagocitos al promover la adherencia al endotelio, sensibiliza a los neutrófilos para la liberación posterior de las especies reactivas del oxígeno, induce respuestas febriles (las respuestas inmunitarias mejoran progresivamente de 33 a 44 °C) etc. Lamentablemente, el exceso de lipopolisacáridos circulante y las citocinas liberadas en respuesta a su presencia conducen a la fisiopatología no deseada en sitios distantes, como el **síndrome de dificultad respiratoria del adulto**, que tiene origen en la invasión masiva del pulmón por los neutrófilos. Hay una alta concentración patológica de óxido nítrico, pero además, los lipopolisacáridos pueden activar la vía alternativa del complemento y esto se relaciona con su capacidad de inducir la liberación de tromboxano A_2 y prostaglandina por las plaquetas, que lleva a la **coagulación intravascular diseminada**.

Mientras que el principal factor en la sepsis por gramnegativos son los lipopolisacáridos, los **microorganismos grampositivos** tienen una variedad de componentes que actúan sobre los elementos defensivos del huésped para iniciar el shock séptico. Así, la adherencia de *Staphylococcus aureus* a los macrófagos induce la síntesis de TNF, y la agregación plaquetaria mediada por peptidoglucano por el mismo microorganismo conduce a la coagulación intravascular diseminada. Las enterotoxinas estafilocócicas y estreptocócicas inducen el síndrome de shock tóxico por mecanismos bastante diferentes. Al actuar como **superantígenos**, reaccionan directamente con familias de receptores particulares de las células T y dan origen a la liberación masiva de citocinas, como TNF y factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIF), que se detectan en concentraciones elevadas en el plasma de pacientes con shock séptico. Diversos tratamientos se encuentran en la fase de investigación. La pentoxifilina bloquea la producción de TNF por los macrófagos. Los modelos experimentales de shock séptico revelan que éste puede ser bloqueado por anti-MIF y por un péptido derivado de la secuencia natural 150-161 de la enterotoxina B estafilocócica, que es parte de un dominio crucial para la activación de las células T.

En el capítulo anterior se hizo referencia al **síndrome periódico asociado con el receptor para el factor de necrosis tumoral** (por sus siglas en inglés, TRAPS) y a la **hemoglobinuria paroxística nocturna**. El consumo excesivo de C3 se asocia con la glomerulonefritis mesangiocapilar y la

lipodistrofia parcial (degeneración del tejido adiposo) en pacientes con el llamado **factor nefrítico C3**, un autoanticuerpo IgG capaz de activar la vía alternativa, que se combina con la convertasa $\overline{C3bBb}$ y la estabiliza.

En los pacientes con **fibrosis pulmonar idiopática** hay una respuesta defectuosa al daño tisular en el pulmón con un desequilibrio entre la reparación de la herida y la fibrinólisis. La producción de TGFβ y TNF por las células epiteliales y los macrófagos lleva a una proliferación de fibroblastos y a la producción excesiva de matriz extracelular. Los agentes antiinflamatorios no tienen beneficio comprobado en esta enfermedad, pero hay ciertos indicios de que el IFNγ puede ejercer ciertos efectos terapéuticos por su actividad antifibrótica.

Las características neuropatológicas distintivas de la **enfermedad de Alzheimer** son las placas extracelulares y los ovillos neurofibrilares intracelulares. Las placas seniles contienen péptidos hidrófobos de β-amiloide de 4 kDa provenientes de la proteína precursora de β-amiloide (APP). Normalmente, esta proteína es desdoblada por una β-secretasa en productos solubles que no pueden formar el fragmento β-amiloide. Sin embargo, en pacientes con esta enfermedad neurodegenerativa se producen los péptidos de 4 kDa patógenos tras el procesamiento proteolítico secuencial de APP por la β-secretasa (BACE, enzima que escinde APP en el sitio β) y la γ- secretasa (compuesta por la presenilina 1 y 2). Se considera que los agregados de péptidos β-amiloides formados por esta vía activan la apoptosis en las neuronas. La variante APOE4 del gen que codifica la apolipoproteína E, un transportador de colesterol, es el único gen de susceptibilidad establecido, aunque también se considera que participan otros genes. Tras la observación de que los pacientes tratados con dosis elevadas de fármacos antiinflamatorios no esteroides (AINE) para enfermedades como la artritis reumatoidea parecen tener una probabilidad menor de desarrollar enfermedad de Alzheimer, se están llevando a cabo ensayos clínicos para probar la capacidad de estos agentes inmunomoduladores de demorar o evitar el comienzo de esta enfermedad.

RESUMEN

- La estimulación excesiva de los mecanismos efectores normales del sistema inmunitario puede conducir al daño tisular, y se habla de reacciones de hipersensibilidad en las que pueden distinguirse varios tipos.

Hipersensibilidad anafiláctica (tipo 1)

- La anafilaxia implica la contracción del músculo liso y la dilatación de los capilares.
- Esto depende de la reacción del antígeno con el anticuerpo IgE específico unido a través de su Fc al receptor de alta afinidad FcεRI del mastocito.
- Los entrecruzamientos y la formación de cúmulos de los receptores de IgE activan la proteína tirosincinasa Lyn, recluta otras cinasas y conduce a la liberación de mediadores de los gránulos, como histamina, leucotrienos y factor activador de las plaquetas, más factores quimiotácticos de eosinófilos y neutrófilos, y otras numerosas citocinas.

Alergia atópica

- La atopia proviene de una respuesta excesiva de IgE contra antígenos extrínsecos (alérgenos) que conduce a reacciones anafilácticas locales en los sitios de contacto con el alérgeno.
- La fiebre del heno y el asma extrínseca representan los trastornos alérgicos atópicos más frecuentes como resultado de la exposición contra alérgenos inhalados. La dermatitis atópica también es sumamente común.
- Mientras que la reacción inmediata contra el alérgeno extrínseco (máximo a los 30 minutos) se debe a la activación de mastocitos, la reacción de fase tardía alcanza su máximo a las 5 horas, con una intensa infiltración de eosinófilos, y es iniciada por la activación de macrófagos alveolares y otros macrófagos a través de la IgE unida a la superficie; el TNF y la IL-10 secretados actúan ahora en las células epiteliales y los fibroblastos para liberar poderosas sustancias quimiotácticas de eosinófilos, como CCL5 y CCL11.
- En el asma, la prolongación grave de la respuesta al alérgeno es causada por células Th2 que mantienen el reclutamiento de eosinófilos perjudiciales para el tejido a través de la liberación de IL-5. La mezcla de poderosos broncoconstrictores, el efecto nocivo de la proteína básica principal de eosinófilos y la hipersecreción de moco estimulada por la IL-13 y la IL-4 contribuyen en conjunto al daño de la vía aérea característico del asma crónica.
- Muchas alergias a los alimentos pertenecen al tipo 1 de hipersensibilidad.
- Factores genéticos de importancia son la tendencia a elaborar el isotipo IgE y genes que codifican varios receptores de reconocimiento de patrón.
- La exposición a infecciones que estimulan a las células Th1 pueden influir fuertemente sobre el "inmunoestado" que establece la tendencia a las respuestas Th1 o Th2; la segunda aumenta el riesgo de alergia a través de la estimulación de la síntesis de IgE y el reclutamiento de eosinófilos.
- El antígeno agresor se identifica por pruebas de punción intradérmica, que se manifiestan por reacciones inmediatas de roncha y eritema, mediante pruebas de provocación y por RAST.
- Siempre que sea posible, el mejor tratamiento consiste en evitar el alérgeno.
- Un anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio de unión al receptor de IgE reduce de modo notable las concentraciones y la síntesis de IgE, y disminuye la capacidad de respuesta de los mastocitos.
- El tratamiento sintomático consiste en el uso de β_2-agonistas de acción prolongada y antagonistas de leucotrienos. El cromoglicato de sodio bloquea la actividad de los canales de cloro y, por lo tanto, estabiliza los mastocitos e inhibe la broncoconstricción. La teofilina es un inhibidor de la fosfodiesterasa que eleva el cAMP intracelular; esto produce broncodilatación.
- El asma crónica está dominada por las células Th2 activadas y se trata con esteroides inhalados que ejercen una gama amplia de acciones antiinflamatorias, como la capacidad de bloquear la producción de mediadores por macrófagos o células Th2 estimulados. Cuando sea necesario, deben complementarse con agonistas β_2 de acción prolongada.

- Los ciclos de inyección o la administración sublingual del antígeno pueden desensibilizar por la formación de anticuerpos IgG bloqueadores o reguladores, o a través de la regulación de células T. Los péptidos de los epítopos de las células T pueden ser manipulados para modular el estado atópico.

Hipersensibilidad citotóxica dependiente de anticuerpos (tipo II)

- Este tipo de hipersensibilidad implica la muerte de células que tienen el anticuerpo adherido a un antígeno de superficie.
- Las células pueden ser captadas por las células fagocíticas a las que se adhieren a través de su cubierta de IgG o C3b, lisadas por la acción del sistema de complemento o destruidas por las células efectoras de la CCDA.
- Son ejemplos: reacciones transfusionales, enfermedad hemolítica del recién nacido a través de la incompatibilidad rhesus, destrucción del injerto mediada por anticuerpos, reacciones autoinmunitarias dirigidas contra los elementos celulares de la sangre y la membrana basal del glomérulo, e hipersensibilidad como resultado de la cubierta de eritrocitos o plaquetas por un fármaco.

Hipersensibilidad mediada por complejos (tipo III)

- Se produce a partir de los efectos de los complejos antígeno-anticuerpo a través de: a) la activación del complemento y la atracción de leucocitos polimorfonucleares que liberan mediadores lesivos para los tejidos cuando se ponen en contacto con el complejo; b) la estimulación de macrófagos que liberan citocinas proinflamatorias; y c) la agregación plaquetaria que causa microtrombos y la liberación de aminas vasoactivas.
- Cuando las concentraciones de anticuerpos circulantes son elevadas, el antígeno se precipita cerca del sitio de entrada en el organismo huésped. La reacción en la piel se caracteriza por la infiltración de neutrófilos, edema y eritema, que alcanza un máximo a las 3-8 horas (reacción de Arthus).
- Los ejemplos son el pulmón de granjero, la enfermedad de los criadores de palomas y la aspergilosis pulmonar, en los cuales los antígenos inhalados provocan concentraciones elevadas de anticuerpos, reacciones contra un incremento abrupto del antígeno causado por muerte de las células bacterianas durante la farmacoterapia para la lepra o la sífilis, poliarteritis nudosa ligada a complejos con el virus de la hepatitis B y un elemento de la lesión sinovial en la artritis reumatoidea.
- Con un *exceso de antígeno* relativo, se forman complejos solubles que son eliminados por la unión a los receptores para C3b CR1 en los eritrocitos. Si este sistema está sobrecargado o si son deficientes los componentes de la vía clásica del complemento, los complejos circulan en su estado libre y se depositan en circunstancias de un aumento de la permeabilidad vascular en ciertos sitios preferidos: glomérulo renal, articulaciones y plexo coroideo.
- Los ejemplos son: glomerulonefritis asociada con lupus eritematoso sistémico (LES) o infecciones por estreptococos, paludismo y coinfección con el virus HIV y el de la hepatitis C, trastornos neurológicos en el LES y panencefalitis esclerosante subaguda, y shock hemorrágico en la infección viral por dengue.

Hipersensibilidad mediada por células o retardada (tipo IV)

- Se basa en la interacción del antígeno con las células T sensibilizadas previamente y representa el daño tisular, que es el resultado de las reacciones inadecuadas de la inmunidad mediada por células.
- Se produce la liberación de diversas citocinas, como IFNγ, que activan los macrófagos y son los causantes de los acontecimientos que suceden en una respuesta de hipersensibilidad retardada típica, como la reacción de Mantoux a la tuberculina, es decir, la aparición tardía de una reacción indurada y eritematosa que alcanza un máximo a las 24-48 horas y se caracteriza desde el punto de vista histológico por la presencia de un infiltrado con fagocitos mononucleares y linfocitos.
- La provocación continua de la hipersensibilidad retardada por la persistencia del antígeno conduce a la formación de granulomas crónicos.
- Las células tipo Th2 que producen IL-5 también pueden causar daño tisular a través de su capacidad de reclutar eosinófilos.
- Las células T CD8 son activadas por los antígenos de la clase I del CMH para convertir directamente las células citotóxicas en diana que portan el antígeno apropiado.
- La producción de IL-22 por las células Th17 en pacientes con psoriasis produce la proliferación de los queratinocitos y una hiperplasia de las células epidérmicas.
- Los ejemplos son el daño tisular en infecciones bacterianas (tuberculosis, lepra), virales (sarampión, herpes), micóticas (candidiasis, histoplasmosis) y parasitarias (leishmaniasis, esquistosomiasis), la dermatitis por contacto causadas por exposiciones a cromatos y hiedra venenosa, las picaduras de insectos y la psoriasis. La enfermedad inflamatoria intestinal puede ser el resultado de reacciones de tipo Th1 (enfermedad de Crohn) o NKT "tipo Th2" (colitis ulcerosa) contra bacterias intestinales. La enfermedad celíaca es una respuesta aberrante contra la gliadina del trigo.

Hipersensibilidad estimuladora (tipo V)

- El anticuerpo reacciona con un componente clave de la superficie como un receptor para hormona "activa" a la célula.
- Un ejemplo es la hiperreactividad tiroidea en la enfermedad de Graves debida a un autoanticuerpo estimulante de la glándula tiroides. En el Cuadro 15.4 se comparan las características de estos cinco tipos de hipersensibilidad adquirida.

Reacciones de hipersensibilidad "innata"

- Algunas infecciones provocan un "síndrome de shock tóxico", que implica la liberación excesiva de TNF, IL-1 e IL-6 y la activación intravascular del complemento.
- El síndrome de dificultad respiratoria aguda asociado con bacterias gramnegativas se debe sobre todo a la endotoxina lipopolisacárido, que provoca la invasión masiva del pulmón por los neutrófilos.
- Los microorganismos grampositivos causan la liberación de TNF y factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIF) a través de la acción directa de los macrófagos y la estimulación de familias de células T seleccionadas por los superantígenos de la enterotoxina.
- La aberración de los mecanismos innatos puede ser una causa subyacente en la fibrosis pulmonar idiopática y contribuye a la formación de las placas de β-amiloide en la enfermedad de Alzheimer.

Cuadro 15.4. Comparación de tipos de hipersensibilidad que involucran respuestas adquiridas.

		Anafiláctica (I)	Citotóxica (II)	Mediada por complejos (III)	Mediada por células (IV)	Estimuladora (V)
Anticuerpo que media la reacción		Ac homocitotrópico Unión a mastocitos	Ac humoral ± FC*	Ac humoral ± FC*	Ninguno (mediada por células T)	Ac humoral no-FC*
Antígeno		Por lo común exógeno (p. ej., polen de césped)	Superficie celular	Extracelular	Asociado con CMH en el macrófago o en la célula diana	Superficie celular
Respuesta al antígeno intradérmico:	Reacción máxima	30 minutos (reacción tardía +)	–	3-8 h	24-48 h	–
	Aspecto	Roncha y eritema	–	Eritema y edema	Eritema e induración	–
	Histología	Desgranulación de los mastocitos; edema (la reacción tardía celular que incluye eosinófilos)	–	Reacción inflamatoria aguda; predominio de neutrófilos	Inflamación perivascular: los polimorfonucleares migran de la lesión y dejan un predominio de células mononucleares	–
Transferencia de la sensibilidad a un individuo normal		←————	Anticuerpos séricos	————→	Células linfoides	Anticuerpos séricos
Ejemplos		Alergia atópica, por ejemplo, fiebre del heno	Enfermedad hemolítica del recién nacido (Rh)	Glomerulonefritis por inmunocomplejos Pulmón de granjero	Reacción de Mantoux para la TB Reacción granulomatosa contra TB Sensibilidad por contacto	Tirotoxicosis

*FC, fijación del complemento.

LECTURAS ADICIONALES

Alcorn J.F., Crowe C.R. & Kolls J.K. (2010) T_H17 cells in asthma and COPD. Annual Review of Physiology 72, 495–516.

Broide D.H. (2009) Immunomodulation of allergic disease. Annual Review of Medicine 60, 279–291.

Chapel H., Haeney M., Misbah S. & Snowden N. (2006) Essentials of Clinical Immunology, 5th edn. Blackwell Publishing, Oxford.

Frew A.J. (2008) Sublingual immunotherapy. New England Journal of Medicine 358, 2259–2264.

Holgate S.T., Church M.K. & Lichtenstein L.M. (2006) Allergy, 3rd edn. Mosby, London.

Medoff B.D., Thomas S.Y. & Luster A.D. (2008) T cell trafficking in allergic asthma: the ins and outs. Annual Review of Immunology 26, 205–232.

Meyer E.H., DeKruyff R.H., & Umetsu D.T. (2008) T cells and NKT cells in the pathogenesis of asthma. Annual Review of Medicine 59, 281–292.

Palomares O. et al. (2010) Role of T regulatory cells in immune regulation of allergic diseases. European Journal of Immunology 40, 1232–1240.

Rothenberg M.E. & Hogon S.P. (2006) The eosinophil. Annual Review of Immunology 24, 147–174.

Sicherer S.H. & Sampson H.A. (2009) Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. Annual Review of Medicine 60, 261–277.

Valenta R. et al. (2010) From allergen genes to allergy vaccines. Annual Review of Immunology 28, 211–241.



CAPÍTULO 16
Trasplante

Conceptos clave

A modo de resumen...

Mientras que las células de la respuesta innata y los linfocitos B de la respuesta adaptativa reconocen el antígeno intacto, los linfocitos T reconocen antígenos procesados en la forma de péptidos presentados por las moléculas del CMH de la superficie celular. A nivel de población, existe una diversidad increíble de genes del CMH que se cree que han evolucionado en respuesta a la diversidad de patógenos. Los mecanismos de recombinación V(D)J asociados con los receptores de anticuerpos y de células T tienen el potencial de generar respuestas a prácticamente cualquier antígeno extraño, incluso las moléculas alogénicas del CMH.

Introducción

Desde hace mucho tiempo, la sustitución de los órganos enfermos por un trasplante de tejido sano se ha convertido en un objetivo importante de la medicina, pero su avance se vio frustrado en gran medida por los esfuerzos poco cooperativos del organismo, que rechaza los injertos procedentes de otros individuos. Lamentablemente, un porcentaje relativamente alto de células T tienen receptores específicos para "alo-CMH", es decir, las variantes del CMH de otros individuos. También pueden producir anticuerpos contra antígenos no propios de los tejidos u órganos trasplantados. Estas limitaciones requieren la compatibilidad del tipo de tejido y la inmunosupresión en la mayoría de los casos de trasplante provenientes de individuos genéticamente no idénticos.

Roitt's Essential Immunology, Twelfth Edition. Peter J. Delves, Seamus J. Martin, Dennis R. Burton, Ivan M. Roitt.



Tipos de injerto

Antes de analizar la naturaleza y las implicaciones del fenómeno de rechazo, es útil definir los términos relacionados con los trasplantes entre individuos y especies.

- *Autoinjerto*: tejido que se injerta de nuevo en el donante original.
- *Isoinjerto*: injerto entre individuos **singénicos** (o sea, de constitución genética idéntica) como, por ejemplo, gemelos idénticos o ratones de la misma cepa endogámica pura.
- *Aloinjerto*: injerto entre individuos **alogénicos** (o sea, miembros de la misma especie pero de constitución genética diferente), como de un ser humano a otro o de un ratón de una cepa a otro de una cepa diferente.
- *Xenoinjerto*: injerto entre individuos **xenogénicos** (o sea, de diferentes especies), por ejemplo, de un cerdo a un ser humano.

La mayoría de los casos de trasplantes clínicos implica el empleo de aloinjertos, aunque hay ahora un gran interés en el uso de injertos provenientes de otras especies. El procedimiento de aloinjerto más común es la transfusión sanguínea, en la que las consecuencias desafortunadas de incompatibilidad abarcan la hemólisis (lisis de los eritrocitos), la coagulación intravascular, los escalofríos y las náuseas. Sin embargo, estos acontecimientos son raros ya que a la sangre por infundir se le realiza normalmente la compatibilidad para los grupos sanguíneos AB0 y Rh (rhesus).

Considerable atención se ha puesto en el rechazo de injertos sólidos como la piel y resulta útil describir la secuencia de fenómenos asociada con este rechazo. Por ejemplo, en los ratones el aloinjerto de piel se establece y se vasculariza a los pocos días. Entre el tercero y el noveno día, se produce una disminución gradual de la circulación y un infiltrado creciente del lecho del injerto por linfocitos y monocitos. La necrosis comienza a visualizarse en forma macroscópica, y un día después el injerto se desprende completamente (Figura A16.1.1). **El rechazo es un fenómeno inmunitario**, dado que revela tanto memoria como especificidad (Avances y descubrimientos 16.1). Además, el receptor de las células T procedentes de un donante que rechazó un injerto experimenta un rechazo acelerado de otro injerto del mismo tipo implantado en un momento posterior (Figura 16.1), lo cual demuestra que las células linfoides están sensibilizadas y conservan la memoria del primer contacto con los antígenos del injerto.

Control genético de los antígenos de trasplante

La especificidad de los antígenos que participan en el rechazo de un injerto está sujeta al control genético. Los individuos genéticamente idénticos, como los ratones de una cepa pura o los gemelos monocigotos, tienen antígenos

Avances y descubrimientos 16.1–Base inmunológica del rechazo de injerto

El campo de los trasplantes mantiene una enorme deuda con Sir Peter Medawar, el destacado científico que inició e inspiró su desarrollo. Incluso a principios del siglo xx se aceptaba el paradigma de que los injertos entre miembros no relacionados de una especie siempre eran rechazados después de un breve período inicial de aceptación (Figura A16.1.1). Las observaciones de Padgett realizadas en 1932 en Kansas, que establecieron que los aloinjertos de piel entre miembros de una familia tendían a sobrevivir más tiempo que entre individuos no relacionados y la demostración crítica de J. B. Brown de St. Louis en 1937, que reveló que los gemelos monocigotos (es decir, con constitución genética idéntica) aceptaban los injertos de piel del otro miembro del par, evidenciaron que el rechazo contaba con un fundamento genético. Sin embargo, la investigación de Medawar a comienzos de la Segunda Guerra Mundial, motivada por la necesidad de tratar al personal de aviación con quemaduras pavorosas, fue la que determinó que el rechazo tenía una base inmunológica. Este autor demostró que un segundo injerto procedente de un donante era rechazado con mayor rapidez e intensidad que el primero, y además, que un injerto no relacionado sufría rechazo con la cinética de la reacción de primer orden (Figura A16.1.2). Este **rechazo de segundo tipo** se caracteriza por **memoria** y **especificidad** y, en consecuencia, presenta los elementos fundamentales de una respuesta inmunitaria. Más adelante, la teoría se confirmó mediante la transferencia de la capacidad para expresar una reacción de segundo tipo a través de los linfocitos.

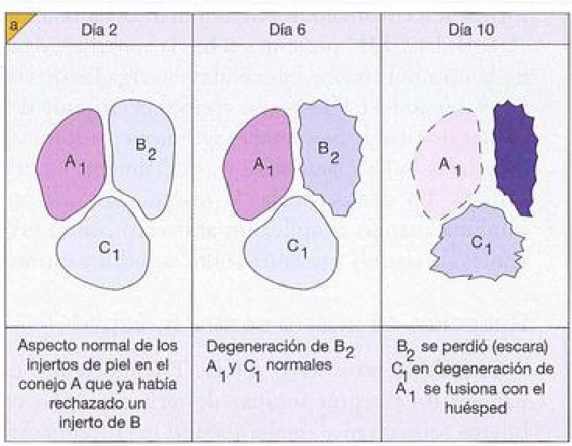
El mensaje era claro: para lograr un trasplante con éxito de teji-



Figura A16.1.1. Aspecto del rechazo de un injerto de piel en ratones.

a) Injerto que sufre rechazo; b) rechazo completo (costra) y, como comparación, c) un injerto de piel completamente curado sin evidencia de rechazo. (Reproducido de McFarland H.I. y Rosenberg A.S. *Current Protocols in Immunology*. Unit Number: UNIT 4.4. DOI: 10.1002/0471142735.im0404s84).

Avances y descubrimientos 16.1–*Continuación*



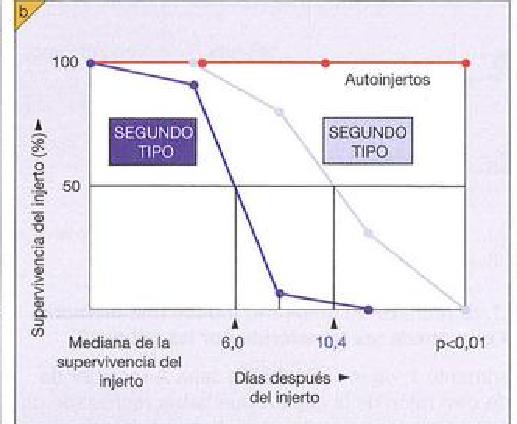


Figura A16-1-2. Memoria y especificidad en el rechazo de un aloinjerto de piel en conejos.

a) Los autoinjertos y los aloinjertos de piel de dos donantes no relacionados B y C se aplican en el conejo A, que ya había rechazado un primer injerto de B (B_1). Mientras el autoinjerto A permanece indemne, el injerto C_1 expuesto por primera vez experimenta un rechazo de primer tipo, mientras que el segundo injerto de B (B_2) se desprende después de muy poco tiempo. b) Mediana de los tiempos de supervivencia de aloinjertos de piel de primero y segundo tipo que muestra un rechazo más rápido del segundo injerto, con una mediana del 50% de supervivencia del injerto de 6 días comparada con la de 10 días para el rechazo de primer tipo. (De Medawar P.B. [1944] *Journal of Anatomy* **78**, 176.)

dos y órganos en el ser humano, se debía superar esa barrera inmunogenética. Murray del Peter Bent Bringham Hospital (Boston) y Hamburger de París obtuvieron un éxito limitado en el trasplante de riñones entre gemelos dicigotos sometidos a irradiación con rayos X subletal. Sin embargo, esta información se pudo confirmar cuando en 1960 Calne y Zukowski aplicaron en forma independiente el informe de Schwartz y Damashek sobre los efectos inmunosupresores del fármaco antimitótico 6-mercaptopurina para prolongar la supervivencia de aloinjertos renales en perros. Después de este experimento, Murray tuvo éxito en 1962, cuando trasplantó riñones cadavéricos no relacionados bajo la protección inmunosupresora de la azatioprina, el derivado más eficaz de la 6-mercaptopurina, descubierto por Hutchinson y Elion.

La historia culmina con un premio Nobel, y los lectores de los relatos históricos podrán obtener más información sobre el desarrollo de este campo y las mentes de los científicos que consiguieron este maravilloso logro de la Medicina en Hakim N.S. and Papalois V. (eds.) (2003) *History of Organ and Cell Transplantation,* Imperial College Press, London y en Brent L. (1996) *A History of Transplantation Immunology,* Academic Press, London.

de trasplante idénticos, por lo cual es posible realizar injertos entre ellos sin inconvenientes. La segregación mendeliana de los genes que controlan a esos antígenos se confirmó en experimentos de apareamiento cruzado entre ratones de cepas puras diferentes. Como estos ratones producen descendencia del mismo fenotipo (*breed true*) y siempre aceptan los injertos de otros ratones del mismo grupo, se concluye que deben ser homocigotos para los genes del "trasplante". A continuación, se considerarán dos cepas de esta clase, A y B, con genes alélicos que difieren en un solo locus. En cada caso, los genes paternos y los maternos son idénticos y presentan una constitución genética que se podría expresar como *A/A* y *B/B*, respectivamente. El cruzamiento entre las cepas A y B origina una primera generación familiar (F1) con constitución *A/B*. Todos los ratones miembros de F1 aceptan los injertos de cualquiera de los padres, y ello demuestra que son, desde el punto de vista inmunológico, tolerantes tanto a A como a B debido a que los antígenos del trasplante procedentes de cada padre se expresan en forma codominante (Figura 4.26). Si se cruzan los individuos de la generación F1 entre sí, se podría esperar una distribución promedio de los genotipos en F2 de la manera ilustrada en la Figura 16.2; sólo una cuarta parte de los individuos no tendría genes *A* y, en consecuencia, rechazaría un injerto de *A* debido a la ausencia de tolerancia, mientras que una cuarta parte rechazaría un injerto de *B* por la misma razón. Así, en cada locus, 3 de 4 miembros de la generación F2 aceptan los injertos provenientes de las cepas paternas.

En el ratón se determinaron alrededor de 40 de estos locus, pero, como vimos antes, predomina un conjunto complejo de locus denominado H-2 (HLA en los seres humanos) que controlan los antígenos del trasplante "fuertes" encargados de desencadenar las reacciones intensas contra los aloinjertos. En capítulos previos se analizaron en detalle la estructura (véase la Figura 4.17) y la biología de este **complejo mayor de histocompatibilidad (CMH)** (véase el Avances y descubrimientos 4.2). Como esos genes experimentan segregación mendeliana y expresión codominante, debe ser evidente que los hermanos resultantes de poblaciones que se mantienen como colonias cerradas exogámicas tengan una probabilidad de 1:4 de presentar identidad respecto del CMH. Los antígenos del trasplante no H-2 o "menores", por ejemplo, el H-Y masculino, son reconocidos como péptidos procesados asociados con moléculas del CMH. No se debe suponer que el término "menor" significa que estos antígenos no pueden dar origen a problemas

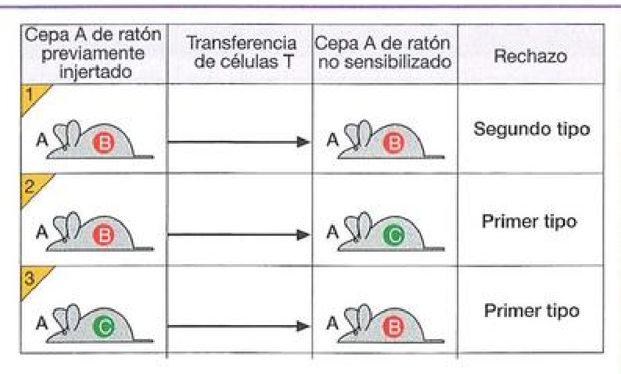


Figura 16.1. El rechazo de un injerto induce una memoria específica que puede ser transferida por las células T.

En el experimento 1, un individuo de la cepa A receptor de células T de otro ratón de la cepa A que había rechazado un injerto de la cepa B experimenta un rechazo acelerado (o sea, de segundo tipo) de un injerto de B. Los experimentos 2 y 3 revelan la especificidad del fenómeno en relación con la tercera cepa C no relacionada desde el punto de vista genético.

		Cruza de cepas de progenitores A y B: *A/A* × *B/B*	Cruza de la generación F1: *A/B* × *A/B*	
		▼	▼	
		F1 *A/B A/B A/B A/B*	F2 *A/A A/B B/A B/B*	
Aceptación del injerto de	A piel:	+ + + +	+ + + −	¾
	B piel:	+ + + +	− + + +	

Figura 16.2. Herencia de los genes que controlan los antígenos del trasplante.

A representa un gen que expresa el antígeno A y *B* representa el gen alélico correspondiente en el mismo locus génico. Las cepas puras son homocigotos para *A/A* y *B/B*, respectivamente. Como estos genes son codominantes, un animal con genoma *A/B* expresa ambos antígenos, es tolerante a ellos y en consecuencia acepta injertos de donantes A y B. La ilustración revela que para cada gen que controla la especificidad del antígeno del trasplante, tres cuartas partes de la generación F2 acepta un injerto de piel paterna. En relación con los genes *n*, la fracción es $(3/4)^n$. Si los animales *A/B* de F1 son cruzados con uno de los padres *A/A*, la mitad de la progenie es *A/A* y la mitad es *A/B*; sólo los segundos aceptan injertos de B.

graves de rechazo, porque sí lo hacen, aunque es más lenta que la asociada con el CMH.

Algunas otras consecuencias de la incompatibilidad del CMH

Las diferencias en las moléculas de clase II del CMH producen una reacción linfocítica mixta

Cuando las células mononucleares de sangre periférica provenientes de individuos con haplotipos de clase II diferentes se cultivan juntas, se produce la activación y la proliferación de los linfocitos (reacción linfocítica mixta), por cuanto las células T pertenecientes a cada población de linfocitos reaccionan contra determinantes de las moléculas de clase II del CMH presentes sobre la superficie de las células de la otra población. Las células encargadas de la respuesta son sobre todo T CD4+, que reciben el estímulo de determinantes de clase II presentados en forma predominante sobre las células B, los macrófagos y especialmente las células dendríticas. En consecuencia, la reacción linfocítica mixta es inhibida cuando se aplica un antisuero contra los determinantes de clase II presentes sobre las células estimuladoras.

Reacción de injerto contra huésped

Cuando se transfieren células T competentes de un donante a un receptor incapaz de rechazarlas, las células del injerto sobreviven y tienen tiempo para reconocer los antígenos del huésped y reaccionar contra ellos a través de una reacción inmunitaria. En lugar de la reacción del trasplante habitual de huésped contra injerto, se produce la reacción inversa, de injerto contra huésped. En el roedor joven, se puede observar inhibición del crecimiento (enanismo), aumento del tamaño del bazo y anemia hemolítica (por la producción de anticuerpos contra los eritrocitos). En el ser humano aparece fiebre, anemia, descenso de peso, exantema, diarrea y esplenomegalia, y los principales mediadores de la entidad son las citocinas, en particular el factor de necrosis tumoral (TNF). Cuanto "mayor" es la diferencia con los antígenos del trasplante, más intensa es la reacción. Cuando el donante y el receptor difieren en los locus HLA o H-2, las consecuencias pueden ser fatales, aunque se debe señalar que las reacciones contra los antígenos menores del trasplante predominantes o contra combinaciones de éstos pueden ser igualmente difíciles de controlar. En la Figura 16-3, se ilustran dos situaciones posibles que ocasionan reacciones de injerto contra huésped. En los seres humanos, éstas pueden surgir en individuos con compromiso inmunitario que reciben injertos de células madre hematopoyéticas, por ejemplo, para tratar la inmunodeficiencia combinada grave o como modalidad terapéutica en el cáncer. Las células T competentes de la sangre o presentes en los órganos injertados en individuos inmunodeprimidos también pueden ser mediadoras de reacciones de injerto contra huésped.

Mecanismos del rechazo del injerto

Varios componentes del sistema inmunitario pueden mediar en el ataque a un órgano o tejido extraño y, por consiguiente, contribuyen para el rechazo **hiperagudo, agudo** o **crónico** (Cuadro 16.1).

Los linfocitos pueden ser mediadores del rechazo

Una función primordial de las células linfoides durante el primer rechazo sería compatible con la histopatología de la reacción temprana, que muestra un infiltrado de células mononucleares con muy pocas células polimorfonucleares o plasmocitos (Figura 16.4). El efecto significativo de la timectomía neonatal sobre la supervivencia de los trasplan-

Cuadro 16.1. Varios tipos de rechazo de injerto.

Rechazo de injerto	Tiempo de evolución	Causa	Características
Hiperagudo	Minutos	Anticuerpos preexistentes debido a incompatibilidad del grupo sanguíneo o presensibilización a las moléculas de clase I del CMH a través de transfusión sanguínea	Los anticuerpos se unen al endotelio de los vasos sanguíneos en el injerto, que producen la activación del complemento, el reclutamiento de neutrófilos, la agregación plaquetaria y la coagulación sanguínea
Agudo	Varios días	Activación de linfocitos	Las células T citotóxicas atacan las células del donante que expresan CMH extraño. Las células T *helper* y las células B colaboran en la producción de anticuerpos contra aloantígenos
Crónico	Meses a años	Varios mecanismos inmunitarios o recurrencia de la enfermedad original	Los mecanismos no se comprenden completamente. Pueden comprender a los linfocitos, los fagocitos, los anticuerpos y el complemento

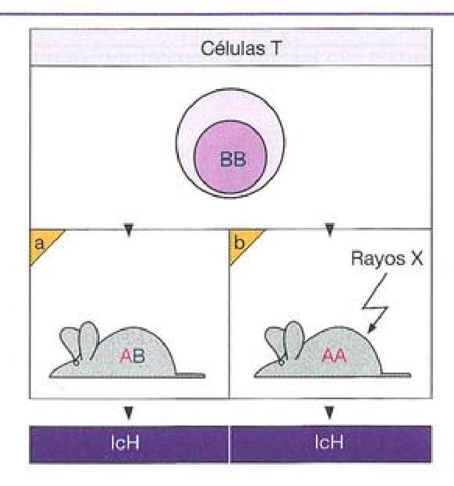


Figura 16.3. Reacción injerto contra huésped.

Cuando se inoculan células T competentes en un huésped incapaz de reaccionar contra éstas, las células trasplantadas tienen libertad para reaccionar contra los antígenos presentes en las células del huésped que reconocen como extraños. La reacción asociada con este rechazo puede ser fatal. Se ilustran dos de las varias situaciones posibles: a) el híbrido AB recibe células de un padre (BB) y las tolera, pero éstas reaccionan contra el antígeno A sobre las células del huésped, b) un receptor AA sometido a rayos X y luego a reparación inmunitaria con células BB no puede reaccionar contra el injerto y experimenta una reacción injerto contra huésped (ICH).

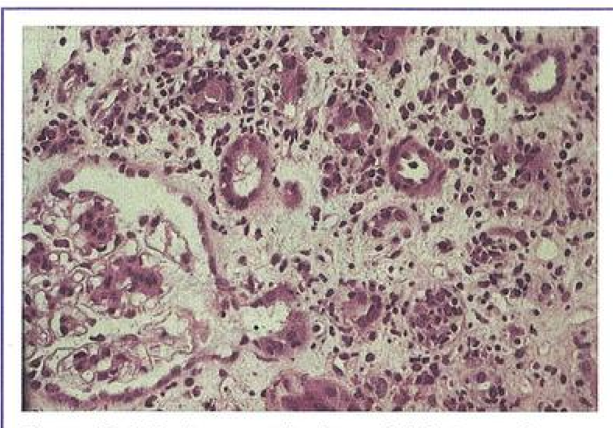


Figura 16.4. Rechazo agudo de un aloinjerto renal humano.

Muestra un infiltrado celular denso del intersticio compuesto por células mononucleares. (Cortesía de M. Thompson y A. Dorling.)

tes de piel y la mayor duración de los injertos realizados en niños con deficiencias tímicas indican que los linfocitos T participan en estas reacciones. En los pollos, el rechazo de homoinjertos y la reactividad de injerto contra huésped se modifican cuando se realiza la timectomía neonatal pero no cuando se practica la bursectomía. Evidencias más directas procedentes de estudios *in vitro* indican que las células T obtenidas de ratones que rechazaron un aloinjerto pueden destruir *in vitro* a las células que contienen antígenos del injerto. Aunque las células T CD8 citotóxicas cumplen una función fundamental en el rechazo del aloinjerto, varios modelos murinos indicaron que, en ausencia de células T CD4, el organismo acepta los aloinjertos de manera indefinida. En realidad, en ausencia de células T CD8, el rechazo podría depender de la acción de las células T CD4, tal vez porque a menudo las células CD4 tienen un potencial citotóxico sobre las células diana que expresan moléculas de clase II. Sin embargo, en los animales intactos, la secreción de citocinas procedentes de las células T CD4 estimula el reclutamiento y la activación de células T CD8, células B, células NKT y macrófagos, y todas estas células pueden contribuir al proceso de rechazo. Además, el interferón γ (IFNγ) estimula la expresión de antígenos sobre las células diana del injerto, lo cual incrementa su vulnerabilidad a las células citotóxicas CD8.

Reconocimiento del CMH alogénico por las células T del receptor

Como el lector recordará, el CMH fue definido por su capacidad de provocar el rechazo de injertos más intenso entre los miembros de la misma especie. La intensidad del rechazo asociado con la incompatibilidad del CMH se debe a la **frecuencia muy elevada de células T alorreactivas** (es decir, células que reaccionan contra los aloinjertos) **presentes en los individuos normales.** Si bien sólo una pequeña proporción de la población de células T normales es específica para un péptido determinado, más del 10% de las células T reacciona contra aloinjertos. Se describieron dos vías principales de reconocimiento. En la **vía directa** se observa una gran cantidad de células T alorreactivas del receptor que reconocen el **alo-CMH** (o sea, **del injerto**) sobre la superficie de las células donantes, mientras que en la **vía indirecta** hay un número más pequeño de células T del receptor que reconocen péptidos provenientes del **alo-CMH** (y aloantígenos menores del trasplante) presentados por las moléculas del CMH del mismo individuo sobre las células presentadoras de antígeno del receptor (Figuras 16.5a y c). En una etapa reciente, se propuso una tercera vía **semidirecta** que consiste en la adquisición de moléculas intactas del CMH provenientes de las células donantes por las células dendríticas del receptor (Figura 16.5b).

El CMH alogénico se diferencia del CMH del receptor sobre todo por los residuos de la hendidura que toman contacto con el péptido procesado, pero las diferencias son mucho menos notables en las regiones helicoidales más conservadas reconocidas por el receptor de la célula T (TCR). Debido a la diferente estructura de la hendidura, el alo-CMH es capaz de unirse a varios péptidos derivados de proteínas compartidas por el donante y el huésped, que podrían no ser capaces de adaptarse a la hendidura del CMH del huésped y, en consecuencia, no inducirían autotolerancia. Así, las células T del huésped que reconocen el alo-CMH y los péptidos compartidos no se eliminarían y quedarían disponibles para reaccionar contra un número grande de péptidos diferentes unidos a la alohendidura de las células presentadoras de antígeno (CPA) del donante, capaces de migrar al tejido linfoide secundario del receptor del injerto. En ciertos casos, pueden depositarse residuos polimorfos

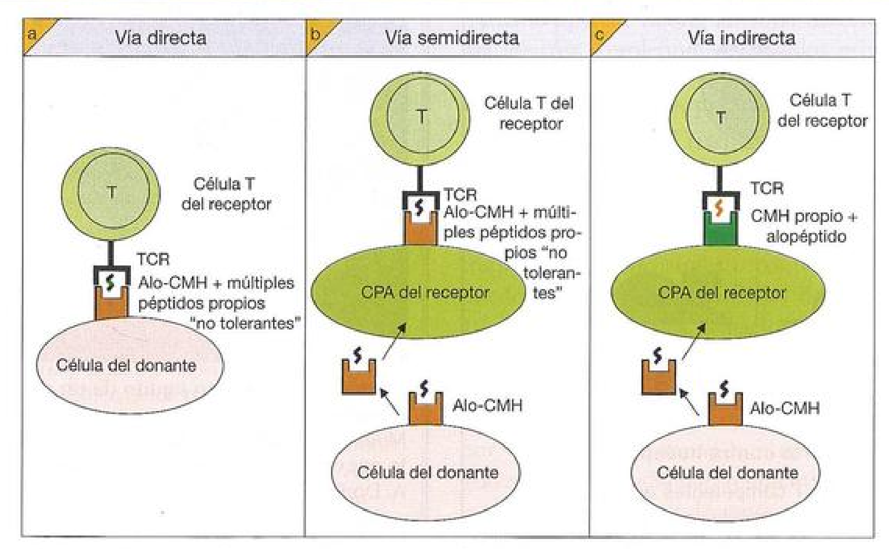


Figura 16.5. Reconocimiento de los antígenos del injerto por células T alorreactivas.

a) **Vía directa.** Los receptores de las células T (TCR) del receptor reconocen directamente el CMH alogénico sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno del donante. Las diferencias polimórficas entre los alotipos del CMH afectan sobre todo la unión de los péptidos en lugar del contacto del TCR con el CMH del donante. En estas circunstancias, las células T del receptor ven a la molécula del CMH alogénico del donante como si perteneciera al CMH "propio" pero, a diferencia del CMH propio, la hendidura del CMH del donante sobre las células presentadoras de antígeno del injerto tiene gran cantidad de péptidos séricos y celulares procesados para los que las células T del huésped capaz de responder no son tolerantes, por lo cual pueden desencadenar una reacción hasta en el 10% de esas células T del huésped. Ello determina la intensidad de la respuesta del aloinjerto. Esta explicación para la frecuencia elevada de células T alorreactivas se confirma además mediante el aislamiento de clones de células T que reaccionan con el CMH propio y el alo-CMH, cada uno unido a una secuencia peptídica diferente. El reconocimiento directo del CMH del donante por las células T del receptor también puede ocurrir si el polimorfismo limitado de la hélice permite la unión accidental e independiente del TCR con el alo-CMH del péptido asociado. La formación de múltiples enlaces de esta naturaleza entre la célula presentadora de antígeno y la célula T podría generar una interacción lo bastante intensa para permitir la activación de la célula T. b) **Vía semidirecta.** Se ha propuesto que las células dendríticas del receptor podrían adquirir moléculas intactas del CMH de las células del donante y presentarlas a las células T del receptor. De nuevo, se presentan los péptidos "no tolerantes" provenientes de los antígenos comunes al donante y al receptor. c) **Vía indirecta.** Las células presentadoras de antígeno (CPA) del receptor procesan el CMH del donante *(marrón)* y las moléculas de histocompatibilidad menores del donante y, como sucede con cualquier molécula proteica, luego presentan los péptidos alogénicos *(marrón)* generados usando sus propias estructuras, o sea, su propio CMH *(verde)*. La población de células T estimuladas por la vía indirecta es pequeña en el primer momento, pero se expande con el tiempo.

dentro de regiones de las hélices del CMH que se ponen en contacto directo con el TCR y, en ocasiones, una proporción del repertorio de células T reacciona en forma cruzada y se une al CMH del donante con gran afinidad. La adhesión de la célula T a la CPA es muy fuerte porque el TCR se une con todas las moléculas del CMH del donante presentes sobre la CPA, mientras que cuando se produce un reconocimiento normal del CMH-péptido, sólo una pequeña proporción de las hendiduras del CMH estará ocupada por el péptido en cuestión. Esas vías directas de inmunización por el CMH del aloinjerto suelen ser iniciadas por las CPA más poderosas, las células dendríticas, y gobiernan los procesos de sensibilización temprana, dado que esta fase aguda del rechazo (véase más adelante) puede ser bloqueada por anticuerpos contra el alo-CMH de clase II.

No obstante, al cabo de cierto tiempo y a medida que las CPA del donante presentes en el injerto son sustituidas por células receptoras, es posible que se inicia otro mecanismo de rechazo basado en una vía de sensibilización indirecta que comprende la presentación de **péptidos alogénicos** procesados por el **CMH del huésped** (Figura 16.5c). Aunque se podría esperar que las células T que reconocen péptidos derivados de las proteínas polimorfas del injerto se presenten con menor frecuencia que las que reconocen antígenos extraños, un injerto que permanece en un mismo sitio durante un período prolongado cuenta con tiempo suficiente para que se expanda esta pequeña población en un medida tal que el rechazo posterior dependería cada vez más de esa vía indirecta. En estas circunstancias, se demostró que los anticuerpos contra el CMH de clase II del receptor prolongan la supervivencia de los aloinjertos renales en las ratas.

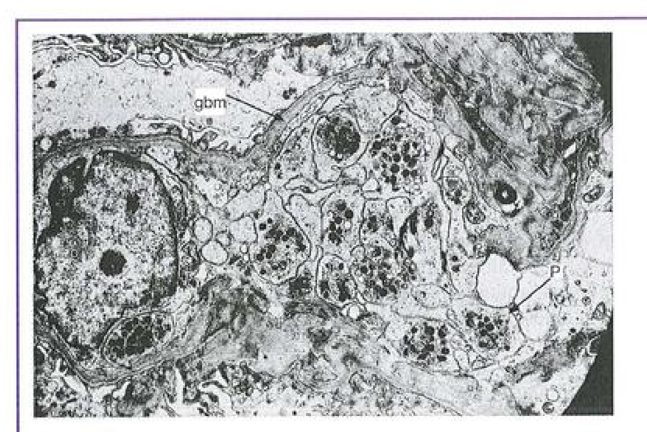


Figura 16.6. Rechazo agudo tardío de un aloinjerto renal humano con agregación plaquetaria en un capilar glomerular inducida por el depósito de anticuerpos sobre la pared del vaso sanguíneo.

Microfotografía electrónica. gbm, membrana basal glomerular; P, plaquetas. (Cortesía de K. Porter.)

Función del anticuerpo

Las células alogénicas pueden ser destruidas por reacciones citotóxicas mediadas por anticuerpos humorales (hipersensibilidad de tipo II) y pueden destruir a las células alogénicas. La descripción de las diferentes vías que conducen al rechazo de aloinjertos de riñón ilustra la contribución de los anticuerpos al proceso de rechazo.

El ***rechazo hiperagudo*** se produce pocos minutos después del trasplante y es el resultado de anticuerpos preexistentes en el receptor que se unen al endotelio de los vasos sanguíneos en el riñón donante. Los anticuerpos activan la vía clásica del complemento e inician la cascada de la coagulación sanguínea. Se bloquean los vasos sanguíneos por el agregado de plaquetas y también se reclutan con rapidez los neutrófilos como consecuencia de la activación del complemento.

El **rechazo agudo** está caracterizado por la infiltración celular densa (Figura 16.4) y la ruptura de los capilares peritubulares. Las célula T citotóxicas $CD8^+$ atacan las células del injerto cuya expresión del antígeno CMH ha sido estimulada por el interferón γ. También hay células T $CD4^+$, incluso las células del fenotipo Th17. En las células del epitelio tubular, hay sobreexpresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 que, en consecuencia, estimula la activación de estas respuestas mediadas por células, ayudadas aún más por la producción local de varias quimiocinas. Si bien algunas células T se sensibilizan dentro del injerto en sí, la presentación del antígeno por las células dendríticas tanto del donante como del receptor se producen sobre todo en los ganglios linfáticos que drenan. El rechazo humoral agudo en el que participan anti-CMH del donante contribuye a los episodios de rechazo agudo en alrededor del 25% de los pacientes con trasplante renal. La unión de anticuerpos específicos con el injerto conduce al depósito de cantidades importantes del componente C4d del complemento en los capilares peritubulares. Los depósitos de inmunoglobulinas en las paredes de los vasos inducen la agregación de las plaquetas en los capilares glomerulares y producen insuficiencia renal aguda (Figura 16.6). También se debe tener en cuenta la posibilidad de que la toxicidad celular dependiente de anticuerpos lesione las células recubiertas por anticuerpos.

El **rechazo crónico** se caracteriza por la fibrosis glomerular y tubular, y a menudo se asocia con depósitos subendoteliales de inmunoglobulina y C4d en los capilares glomerulares y peritubulares. A veces, esto puede ser la expresión de un trastorno por inmunocomplejos en curso (que causó la enfermedad renal por la que se consideró la necesidad de sustituir el riñón afectado) o tal vez la formación de complejos con antígenos solubles provenientes del riñón injertado.

La complejidad de las acciones y las interacciones entre los factores celulares y humorales que participan en el rechazo del injerto es, por lo tanto, considerable y en la Figura 16.7 se intenta resumir los mecanismos que intervienen.

Asimismo, hay circunstancias en las que los anticuerpos pueden proteger al injerto de su destrucción, fenómeno que se denomina "realce" (*enhancement*).

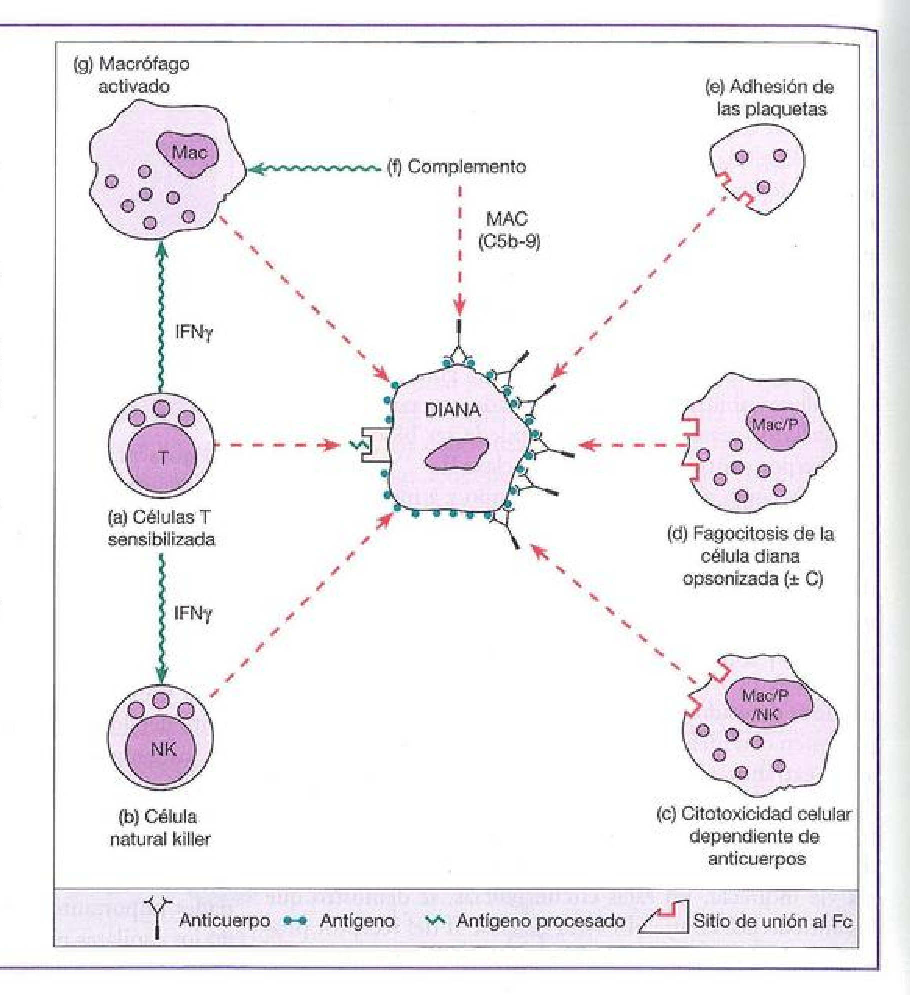
Prevención del rechazo del injerto

Compatibilización entre los tipos de tejidos del donante y el receptor del injerto

Si se tiene en cuenta el hecho de que la demanda de trasplante supera ampliamente la oferta de órganos disponibles

Figura 16.7. Mecanismos de destrucción de la célula diana.

a) Destrucción directa por las células Tc y lesión tisular indirecta a través de la liberación de citocinas, como IFNγ y TNF, procedentes de las células Th1. b) Destrucción directa por las células NK estimuladas por interferón. c) Ataque por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. d) Fagocitosis de la célula diana recubierta por anticuerpos (que se incrementa cuando se fija C3b). e) Adhesión de las plaquetas a los anticuerpos unidos a la superficie del endotelio vascular del injerto que conduce a la formación de microtrombos. f) Citotoxicidad mediada por complemento. g) Los macrófagos activados de manera inespecífica por agentes como IFNγ y tal vez C3b pueden ser citotóxicos para la células del injerto, quizá a través de la acción extracelular del TNF y los radicales O_2^- generados en la superficie de la célula. IFN, interferón; Mac, macrófago; NK, célula *natural killer*, P, leucocito polimorfonuclear; TNF, factor de necrosis tumoral.



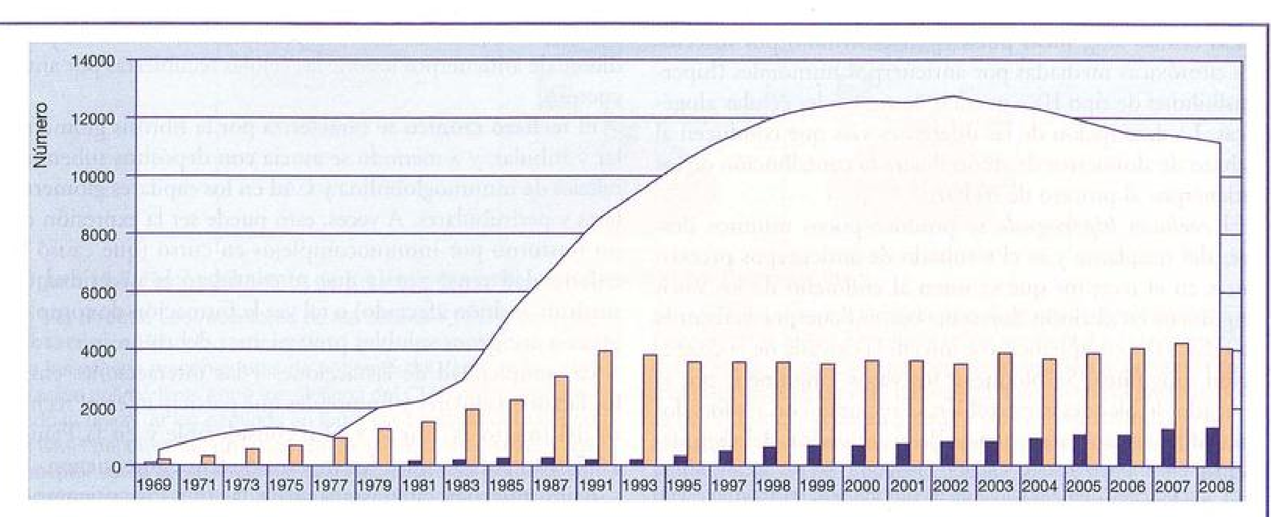


Figura 16.8. Demanda insatisfecha de trasplantes renales.

Dinámica de la lista de espera para trasplante renal de la Eurotransplant y de los trasplantes realizados entre 1969 y 2008. La línea curva indica el número de pacientes que esperan un trasplante renal, y debajo se muestra un histograma con el muy escaso número de trasplantes realizados, con trasplantes de donantes fallecidos indicado por las barras anaranjadas y de donantes vivos por las barras negras.

(Figura 16.8), es fundamental maximizar las posibilidades de que el injerto sea aceptado desde el punto de vista inmunitario por el receptor. Dado que las diferencias en el CMH provocan el rechazo más potente, el principal esfuerzo se ha centrado en la definición de las especificidades de estos antígenos con el fin de reducir al mínimo el rechazo a través de la compatibilización del injerto con el receptor de una manera bastante similar a la empleada para compatibilizar a los individuos que donan y reciben sangre para una transfusión sanguínea (incidentalmente, el grupo AB0 aporta antígenos fuertes del trasplante).

Tipificación del HLA tisular

Los alelos del HLA humano se definen de acuerdo con su secuencia de genes, y los individuos se pueden tipificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando pares de cebadores discriminativos. Las moléculas codificadas por los locus del *HLA-DP, HLA-DQ* y *HLA-DR* de clase II estimulan respuestas de células T CD4, mientras que los productos de los genes *HLA-A, HLA-B* y *HLA-C* actúan sobre células T CD8 alorreactivas.

Polimorfismo del sistema HLA del ser humano

Con tantos alelos en cada locus y varios locus en cada individuo (Figura 16.9), se aprecia con facilidad que ello origina un grado excepcional de polimorfismo. Esto es muy importante para las especies, ya que la necesidad de que las células T reconozcan sus propias especificidades individuales proporciona un mecanismo de defensa contra el mimetismo molecular de los microorganismos por el cual una especie completa podría entrar en situación de riesgo al no ser capaz de reconocer como extraño a un microorganismo que genera complejos entre el CMH y péptidos similares a los propios. También es posible que el grado elevado de polimorfismo contribuya en cierto modo a mantener la diversidad del reconocimiento antigénico dentro del sistema

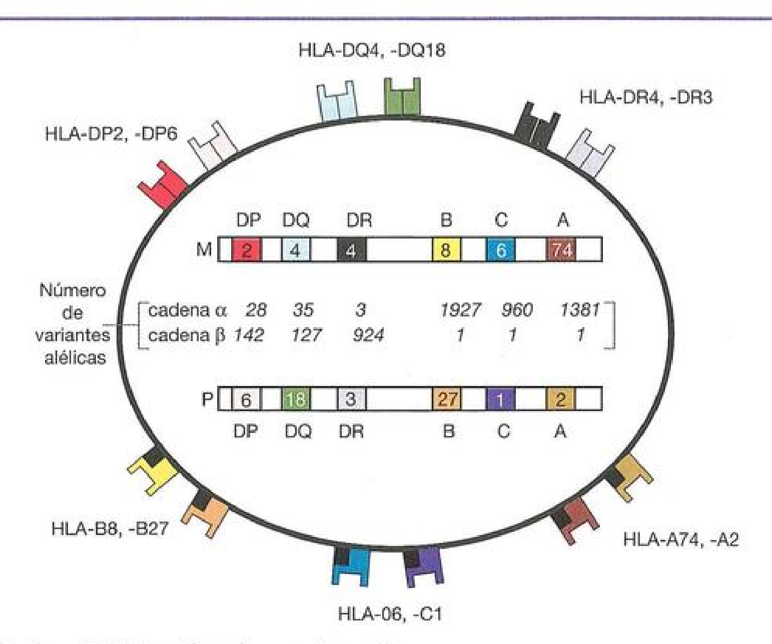


Figura 16.9. Especificidades del HLA polimorfo y su herencia.

Como cada locus puede contener varios alelos, la posibilidad de que un par de individuos seleccionados al azar de la población general tengan especificidades del HLA idénticas es muy baja. En realidad, los genes del CMH de clases I y II son los más polimorfos del genoma y la cantidad de variedades alélicas diferentes basadas en las secuencias de nucleótidos asignadas en octubre de 2010 se indica con los números en bastardilla en el centro de la figura (datos de http:/www.anthonynolan.org.uk/HIG). En el ejemplo presentado, el individuo expresa los alelos específicos de las cadenas α y β en los locus DP (véase la Figura 4.22) sobre el cromosoma materno que especifica HLA-DP2 y heredó los genes para HLA-DP6 sobre el cromosoma paterno (P). Estos genes se expresan en forma codominante y, en consecuencia, las células pueden presentar hasta seis alelos diferentes de las moléculas principales de clase I y por lo menos hasta seis moléculas diferentes de clase II adicionales sobre las células presentadoras de antígeno profesionales. El hecho de que en general se hereden dos genes DRβ en las dos copias del cromosoma 6 y la posibilidad de que se produzca un apareamiento *trans* y un apareamiento *cis* de algunas cadenas α y β de clase II aumentan en forma adicional la diversidad de HLA en el individuo. En cambio, la homocigosidad en cualquiera de los locus reduce el número de variedades. Se debe señalar que no todos los polimorfismos en la secuencia de nucleótidos producen polimorfismos en el nivel de proteínas y que no todos los polimorfismos en la cadena polipeptídica afectan la unión de los péptidos antigénicos o de los receptores de la célula T con las moléculas del CMH y, por lo tanto, influyen sobre el rechazo del trasplante. Todas las moléculas del CMH de clase I emplean la misma cadena β, la β_2-microglobulina, que no es polimorfa, está codificada fuera del CMH y no forma parte de la hendidura de unión al péptido. Se observa una probabilidad de 1:4 de que dos hermanos tengan CMH idénticos porque cada grupo de especificidades sobre un solo cromosoma forma un haplotipo que se suele heredar en bloque y origina cuatro combinaciones posibles de los cromosomas paternos y maternos. Los progenitores y la progenie sólo pueden ser idénticos (probabilidad de 1:2) si la madre y el padre tienen un haplotipo en común.

linfático de una especie determinada y asegure la heterocigosis (vigor híbrido).

El valor de la compatibilización de los tipos de tejido

Los progresos en las técnicas quirúrgicas y el empleo de fármacos como la ciclosporina disminuyeron los efectos de la incompatibilidad entre las especificidades del HLA sobre la supervivencia de los injertos sólidos; no obstante, la mayoría de los especialistas en trasplante promueve la búsqueda de un grado razonable de compatibilidad (véase la Figura 16.18). La tipificación de los tejidos se puede llevar a cabo mediante métodos serológicos que emplean paneles de anticuerpos, cada uno específico para un alelo del HLA diferente, y permiten detectar variedades del HLA sobre la superficie de los leucocitos. En la actualidad, estas técnicas se han ido remplazando por procedimientos de genética molecular, como el uso de oligonucleótidos cebadores con secuencias específicas para la identificación de las variedades. La compatibilización del HLA-DR es la más importante, seguida por la del HLA-B y el HLA-A. En realidad, sólo se suelen tipificar estos tres locus, aunque en estudios recientes se sugirió que la tipificación del HLA-C también podría ser beneficiosa para aumentar el éxito de algunos trasplantes. Se cree que las incompatibilidades en el HLA-DQ son en general menos importantes, y las presentes en el locus HLA-DP parecen producir consecuencias mínimas. Además de tipificar a los receptores y los probables donantes, se realiza una compatibilización cruzada para descartar la preexistencia en el posible receptor de anticuerpos contra antígenos del donante. Los trasplantes de células madre hematopoyéticas, como los de médula ósea, requieren un grado muy elevado de compatibilidad porque es más probable que se desarrolle una enfermedad de injerto contra huésped además de una reacción de huésped contra injerto; el aumento de la precisión de los métodos de tipificación del DNA y el agregado de la tipificación del HLA-DQ pueden ser muy útiles en esta situación.

Debido a los varios miles de fenotipos diferentes de HLA posibles (Figura 16.9), se suele trabajar con una gran cantidad de receptores potenciales sobre una base continental (Eurotrasplante) de manera que, cuando se consiga el material para el injerto, pueda llevarse a cabo la tipificación más apropiada. La posición mejora cuando es posible incrementar el conjunto de órganos disponibles por medio del desarrollo de bancos para el almacenamiento de tejidos a largo plazo, pero todavía las técnicas no son bastante adecuadas para este propósito, excepto en el caso de las células madre hematopoyéticas, que pueden permanecer viables incluso después de su congelamiento y descongelamiento. Cuando se deben injertar órganos pares como el riñón, se pueden utilizar donantes vivos; los hermanos tienen las máximas probabilidades de tener buena compatibilidad. Sin embargo, el empleo de donantes vivos se asocia con dificultades éticas, y los órganos se obtienen con mayor frecuencia de donantes con muerte cerebral en los que se ha perdido incluso la función del tronco encefálico, que controla la respiración.

Hay un interés creciente en la posibilidad de emplear órganos de animales (véase más adelante) o sustitutos mecánicos, al tiempo que algunos médicos intentan prevenir en primer lugar las enfermedades que generan la necesidad del trasplante.

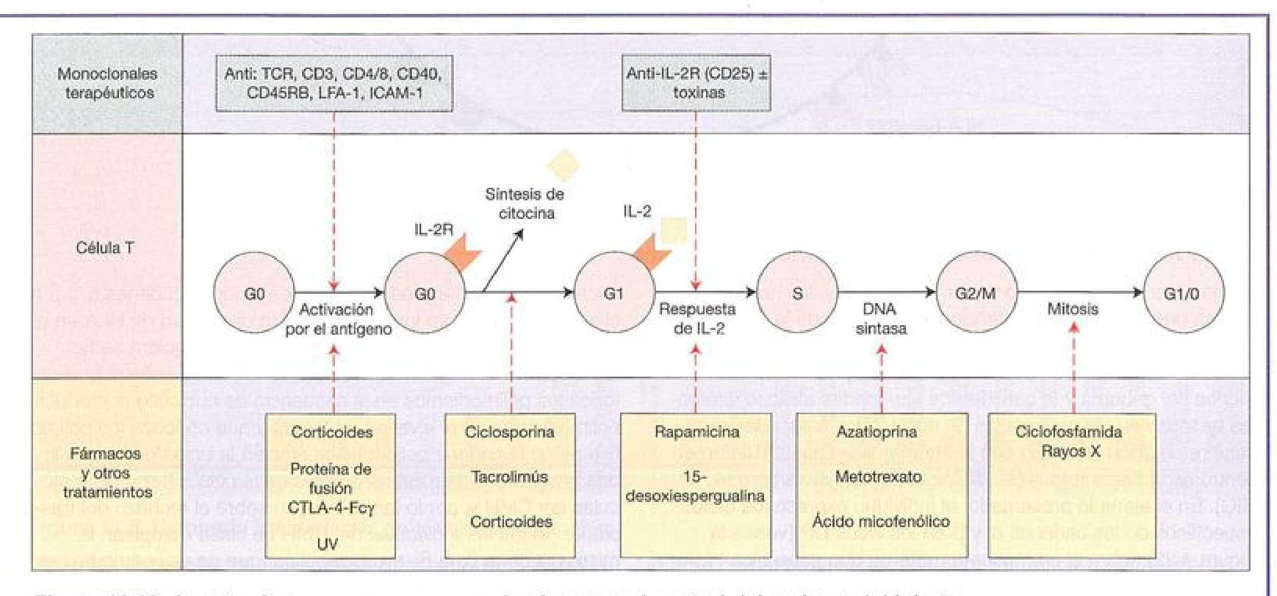


Figura 16.10. Agentes inmunosupresores empleados para el control del rechazo del injerto.

El microfenolato de mofetilo es un inmunosupresor potente que cuando se convierte en el análogo de purina ácido micofenólico inhibe la proliferación, pero también suprime la expresión de CD25, CD71, CD154 (CD40L) y CD28. Otro fármaco potente es la 15-desoxiespergualina (DSG), que interfiere con la función linfocítica a través de su unión con la proteína de choque térmico y posiblemente de la inhibición de la translocación de NFκB al núcleo. El tratamiento simultáneo con fármacos que actúan en estadios secuenciales del desarrollo de la respuesta de rechazo posiblemente crea un sinergismo intenso, lo cual se hace evidente con claridad con la combinación de ciclosporina y rapamicina.

Agentes que producen inmunosupresión general

El rechazo de injertos puede ser inhibido con la administración de fármacos que interfieren de manera inespecífica sobre la inducción o la expresión de la respuesta inmunitaria (Figura 16.10). Como estos agentes son inespecíficos, los pacientes sometidos a tratamientos inmunosupresores tienden a ser susceptibles a las infecciones, además de la mayor propensión al desarrollo de cánceres linforreticulares, en particular los de etiología viral.

Poblaciones linfoides como diana

Los anticuerpos monoclonales anti-CD3 se utilizan en forma extensa como reactivos contra las células T para revertir el rechazo agudo del injerto. Al comienzo se usó el anticuerpo monoclonal del ratón OKT3, y aunque se demostró que ejercía un efecto beneficioso, su eficacia se atenuaba en cierta medida debido a su inmunogenicidad en el huésped humano. Además, este anticuerpo tiene una actividad mitógena responsable del desencadenamiento de un síndrome grave por liberación de citocinas con síntomas "seudogripales". Estos problemas se resolvieron gracias al empleo de anticuerpos creados por ingeniería genética. El anticuerpo otelixizumab (ChAglyCD3) es una versión humanizada no mitógena de un anticuerpo monoclonal de rata con una mutación en la posición 297 de la cadena pesada para evitar la glucosilación y, en consecuencia, la unión con receptores para Fc y complemento. El teplizumab, un anticuerpo humanizado OKT3γ1 Ala-Ala en el cual las leucinas se sustituyeron por alaninas en las posiciones 234 y 235 para evitar la unión al FcγR, es también no mitógeno y eficaz.

La cadena α del receptor de IL-2 (CD25), que expresan las células T activadas pero no las que se encuentran en reposo, representa otra diana útil. El daclizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-IL-2Rα y el basiliximab es un anticuerpo quimérico (región V del ratón, región C humana) con especificidad similar. Estos anticuerpos pueden ser particularmente beneficiosos para la prevención del rechazo agudo del trasplante de riñón cuando se combinan con ciclosporina y corticoides.

Otro agente biológico eficaz es el belatacept, una proteína de fusión del dominio extracelular de CTLA-4 con el Fc de la IgG1 humana en la que las dos sustituciones de Fc en CTLA-4 proveen mayor capacidad para bloquear la actividad de las moléculas coestimuladoras CD80/CD86 necesarias para la activación de la célula T. En los ensayos clínicos de fase II, este fármaco mostró ser tan eficaz como la ciclosporina, pero con menos efectos perjudiciales sobre el riñón.

Fármacos inmunosupresores

El desarrollo de una respuesta inmunitaria requiere la proliferación activa de una cantidad relativamente pequeña de linfocitos sensibles a los antígenos para constituir una población de células sensibilizadas lo bastante grande para ser efectiva. Muchos de los fármacos inmunosupresores que se emplean en la actualidad se utilizaron en primer lugar como quimioterapia contra el cáncer debido a su toxicidad contra las células en vías de división. Además de las complicaciones de la inmunosupresión generalizada mencionadas antes, estos fármacos antimitóticos son tóxicos, en especial para las células de la médula ósea y el intestino delgado y, en consecuencia, deben administrarse con gran precaución.

Un fármaco utilizado con frecuencia en este campo es la **azatioprina**, que inhibe la síntesis de ácidos nucleicos y ejerce un efecto predominante sobre las reacciones mediadas por células T. Otro fármaco, el **metotrexato**, a través de su acción como antagonista del ácido fólico, también inhibe la síntesis de los ácidos nucleicos. El derivado de la mostaza nitrogenada **ciclofosfamida** ataca al DNA por alquilación y formación de entrecruzamientos, lo cual impide la duplicación correcta durante la división celular. Estos agentes parecen ejercer sus efectos nocivos sobre las células durante la mitosis y, por tal razón, son más potentes cuando se administran después de la presentación del antígeno en el momento en que se dividen las células sensibles al antígeno. Un grupo llamativo de metabolitos de los hongos logró un efecto notable en los trasplantes humanos y en el tratamiento de los trastornos inmunitarios debido a su capacidad para actuar sobre las células T. La **ciclosporina** (Sandimmune, o su versión de microemulsión Neoral que presenta mayor biodisponibilidad) es un péptido cíclico con el aminoácido 11 hidrófobo neutro producido por el hongo *Beauvaria nivea* que bloquea en forma selectiva la transcripción de la IL-2 en las células T activadas. Las células en reposo portadoras de memoria vital relacionada con la inmunidad contra las infecciones microbianas son respetadas y se produce escasa toxicidad en las células intestinales y de la médula ósea en vías de división. El fármaco también afecta directamente a las células dendríticas inhibiendo algunas de sus funciones, como el procesamiento de los antígenos, la producción de TNF e IL-12, la expresión de receptores para quimiocinas y la migración celular. La ciclosporina es un fármaco probado como primera línea para la profilaxis y el tratamiento del rechazo del trasplante; en la Figura 16-11 se presenta un ejemplo de su empleo en el trasplante de riñón. Otro fármaco inmunosupresor específico para las células T, el **tacrolimús** (FK506), contiene una estructura anular de macrólido y aunque en un inicio se lo encontró en un

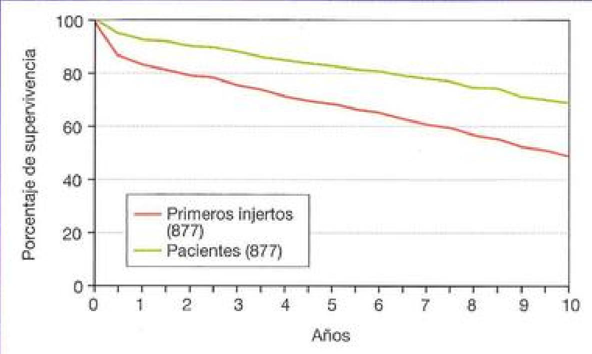


Figura 16.11. Supervivencia de los primeros injertos de riñón cadavérico en 877 pacientes tratados en el Oxford Transplant Centre con tratamiento triple de ciclosporina, azatioprina y prednisolona.

(Datos proporcionados por cortesía de Peter J. Morris.)

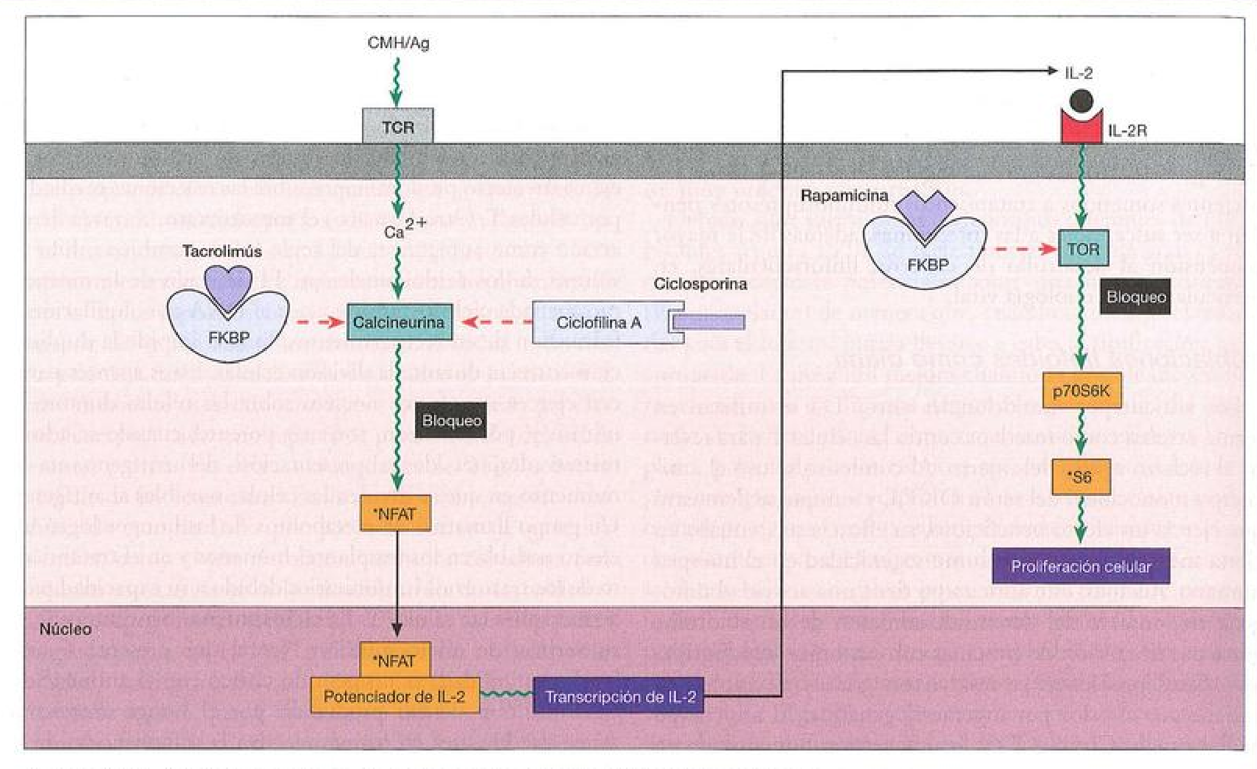


Figura 16.12. Modo de acción de la ciclosporina, el tacrolimús y la rapamicina.

Los complejos formados entre la ciclosporina y la ciclofilina A y entre el tacrolimús y la FKBP (proteína de unión al FK506 [tacrolimús]) se unen e inactivan a la fosfatasa calcineurina responsable de la activación del factor de transcripción, el factor nuclear de las células T activadas (NFAT), para la síntesis de IL-2. El complejo rapamicina-FKBP inhibe la cinasa TOR (diana de la rapamicina) y de esta manera bloquea la activación de la p70 S6 cinasa por las señales transducidas de la IL-2, lo cual permite inhibir la proliferación celular.

hongo, se lo obtiene de la bacteria *Streptomyces tsukubaensis.* Al igual que la ciclosporina, este fármaco bloquea diversas actividades de las células T y las células dendríticas. La **rapamicina** (sirolimús), un producto de *Streptomyces hygroscopicus,* también es un macrólido pero, a diferencia del tacrolimús, bloquea las señales inducidas por la combinación de la IL-2 con su receptor.

Respecto de los detalles moleculares acerca del modo de acción de estos fármacos, la ciclosporina forma complejos con la ciclofilina A, un miembro de la familia de la **inmunofilina**, mientras que el tacrolimús forma complejos con otro miembro de la familia de la inmunofilina, la proteína de unión a FK (FKPB) (Figura 16.12). Estos complejos interactúan con la fosfatasa dependiente de calcio y calmodulina, denominada calcineurina, y la inhiben, lo cual determina la activación del factor de transcripción NFAT (factor nuclear de las células T activadas) para la IL-2 en las células T activadas. Aunque la rapamicina también se une con el FKBP, el complejo ejerce una actividad bastante distinta e inhibe a la cinasa serina/treonina TOR (diana de la rapamicina). La actividad inmunosupresora de la rapamicina se explica, al menos en parte, en la función central de TOR en la transducción de las señales proliferativas, como las mediadas por el receptor para IL-2. Además de su papel en el trasplante, también se evaluó la acción de la ciclosporina en una gran variedad de trastornos en los que se presumen reacciones de hipersensibilidad mediadas por células T. En realidad, los beneficios de la ciclosporina en ciertas enfermedades como la artritis reumatoide, la psoriasis, el síndrome nefrótico idiopático, la diabetes tipo 1, el síndrome de Behçet, la enfermedad de Crohn activa, la anemia aplásica y el asma grave dependiente de corticoides se interpretaron como compatibles o confirmadores de una función patogénica del sistema inmunitario. La inhibición de la proliferación de los queratinocitos por la ciclosporina puede contribuir a la evolución favorable observada en los pacientes con psoriasis tratados con este fármaco. Las características comunes del tratamiento con ciclosporina son el beneficio rápido y la recurrencia después de su suspensión. Por supuesto, se observan efectos colaterales y el más significativo es la nefrotoxicidad. Se deben emplear dosis inferiores a las que ocasionan fibrosis renal por la estimulación de la producción de TGFβ por varios tipos celulares.

El tacrolimús es muy superior a la ciclosporina sobre una base molar en los estudios *in vitro,* pero no es sustancialmente más eficaz. Como la ciclosporina y la rapamicina actúan en diferentes estadios de la activación de la célula T (Figura 16.10), revelan un grado importante de sinergia que permite emplearlas en dosis bastante menores con la reducción correspondiente de los efectos colaterales. Los corticoides, como la prednisolona, actúan en varios puntos de la respuesta inmunitaria, por ejemplo, al afectar la recirculación

de linfocitos y la generación de células efectoras citotóxicas; además, su gran potencia antiinflamatoria depende de sus características, como la inhibición de la adhesión de los neutrófilos al endotelio vascular en la zona inflamada y la supresión de funciones de los monocitos y los macrófagos, como la actividad microbicida y la respuesta a las citocinas. Los corticoides forman complejos con receptores intracelulares que luego se unen a genes reguladores e inhiben la transcripción de TNF, IFNγ, IL-1, IL-2, IL-3, IL-6 y moléculas de clase II del CMH, es decir, bloquean la expresión de las citocinas tanto de los linfocitos como de los macrófagos, mientras que la ciclosporina ejerce su acción principal sobre los primeros.

Inducción de tolerancia a los antígenos del injerto

Para evitar las desventajas de la depresión generalizada, se debe intentar la desactivación aislada de la reactividad del huésped contra los antígenos del injerto, con conservación del resto del aparato inmunitario indemne, o sea, la inducción de **tolerancia específica al antígeno.**

Se descubrió que las células hematopoyéticas representan una excelente fuente de aloantígenos inductores de tolerancia y se comprobó que la producción de quimerismo mixto por injertos de estas células provenientes de la médula ósea es un medio importante para inducir una tolerancia poderosa específica en el trasplante de órganos sólidos que supera las incompatibilidades del CMH. Sin embargo, el éxito del trasplante alogénico de médula ósea en adultos inmunocompetentes suele requerir un tratamiento citoablativo de los receptores con irradiación o fármacos citotóxicos, lo cual tiende a restringir su empleo en enfermedades malignas. Un estudio reciente más alentador en ratones demostró la posibilidad de inducir tolerancia duradera no sólo para las células de la médula ósea, sino también para injertos de piel con incompatibilidad del CMH en receptores no sensibilizados que recibieron dosis elevadas de trasplantes de médula ósea y el **bloqueo de coestimuladores** mediante inyecciones de anticuerpos monoclonales anti-CD154 (CD40L) más una proteína de fusión CTLA-4-Ig (Figura 16.13). Se logra un macroquimerismo hematopoyético persistente con una proporción significativa de linfocitos del donante en el timo, lo cual indica una deleción intratímica de las células T reactivas del donante.

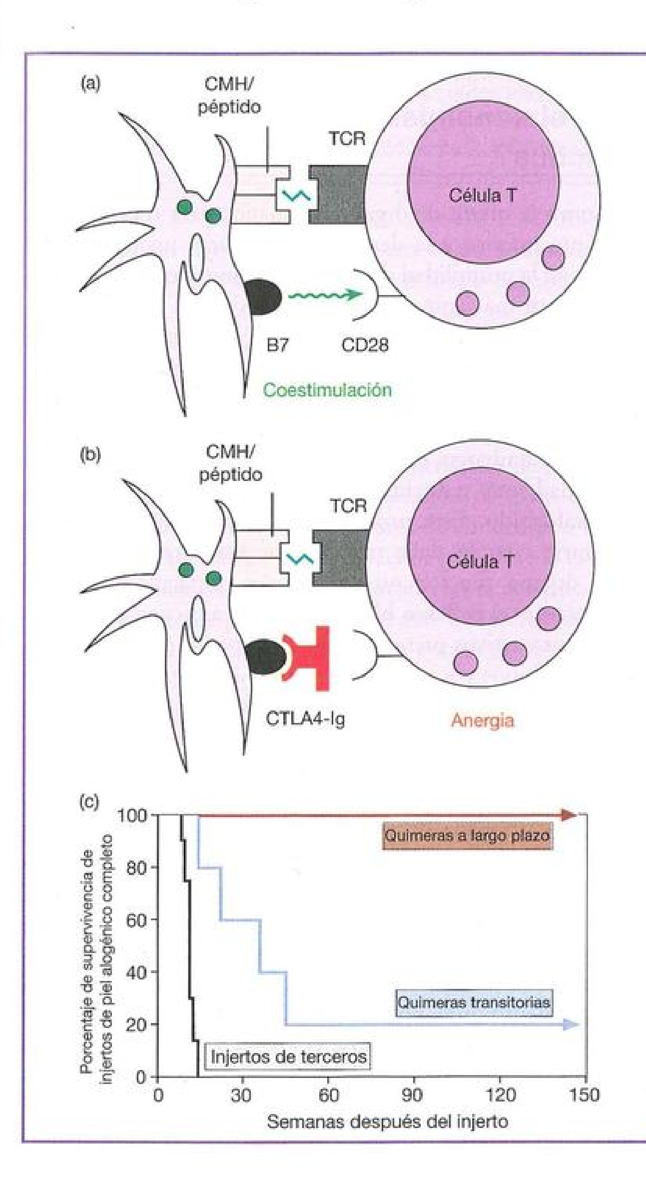


Figura 16.13. Bloqueo coestimulador.

a) La activación de la célula T requiere señales coestimuladoras, en particular la ocupación del CD28 en la superficie de la célula T por las moléculas B7 (CD80 y CD86) en la célula presentadora de antígeno. b) El CTLA-4 se une a CD80/86 con mayor afinidad que CD28 y, por consiguiente, la proteína de fusión soluble CTLA-4-Ig es capaz de bloquear estas señales coestimuladoras, que producen la anergia de las células T. De manera similar, un anticuerpo monoclonal contra el CD40L de la célula T bloquearía las señales coestimuladoras provistas normalmente por CD40 en la célula presentadora de antígeno. c) Inducción de tolerancia y macroquimerismo por el trasplante de médula ósea completamente alogénico más bloqueo coestimulador. Los ratones B6 recibieron células de la médula ósea de la cepa totalmente alogénica B10.A junto con inyecciones de anti-CD154 (CD40L) y la proteína de fusión CTLA-4-Ig que bloquea las interacciones entre CD80 y CD86 con CD28. Ocho ratones con persistencia de células del donante de linajes múltiples (macroquimerismo) durante un período prolongado revelaron tolerancia completa a los injertos de piel de B10.A. Cinco ratones con quimerismo transitorio mostraron una prolongación moderada de la supervivencia del injerto de piel en relación con los injertos de animales no relacionados. (Datos obtenidos de Wekerle T y cols. [2000] *Nature Medicine* **6**, 464, con autorización.)

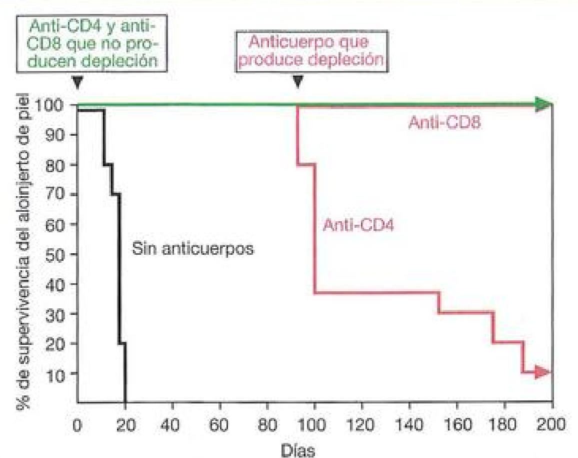


Figura 16.14. Inducción de tolerancia al aloinjerto por anti-CD4 y anti-CD8 que no producen depleción celular.

La inyección concurrente de anticuerpos monoclonales IgG2a contra CD4 y CD8 que no inducen depleción celular (*flecha de color verde*) produjo tolerancia a los injertos cutáneos de donantes con múltiples incompatibilidades en los antígenos menores del trasplante. El mantenimiento de la tolerancia depende de la presencia continua del antígeno que permite que las células incapaces de responder interactúen con células inmunocompetentes recién originadas sobre la superficie de las mismas células presentadoras de antígeno y las induzcan a no responder a través de un mecanismo de tolerancia infecciosa (véase las Figuras 11.8 y 18.31). La pérdida de la tolerancia cuando se eliminan las células CD4, pero no las células CD8 *(flechas de color rojo)*, revela que un subpoblación de células CD4 conserva la tolerancia activa. En realidad, la tolerancia se puede transferir a través de células T reguladoras $CD4^+$ $CD25^+$. (Figura elaborada a partir de datos proporcionados por cortesía de S.P. Cobbold y H. Waldmann.)

Si bien este protocolo permite la supervivencia de los injertos de médula ósea y de órganos sólidos en el largo plazo, es probable que la inhibición directa con anticuerpos anti-CD154 y CTLA-4-Ig sea suficiente para inducir tolerancia a los injertos de órganos sólidos. En presencia de bloqueo de coestimuladores, el injerto estimula las células T alorreactivas y promueve la apoptosis, proceso desencadenado por la rapamicina que mejora el estado de tolerancia. Bcl-XL (véase la Figura 10.4) impide tanto la apoptosis de las células T como la inducción de tolerancia con este tratamiento, lo cual destaca la importancia de la deleción apoptósica de las células T para el establecimiento de la incapacidad de responder a un antígeno específico. No obstante, las células T apoptósicas "regresan de la muerte" a través de la producción de IL-10, de manera que su fagocitosis, junto con la del antígeno, conduce a la presentación de éste en una forma que mantiene la tolerancia gracias a la producción de células inmunorreguladoras.

A pesar de la función de la célula dendrítica *madura* como estimulante principal de las células T en reposo, los *precursores* de la célula dendrítica pueden presentar el antígeno sin coestimuladores B7 y parecen ser capaces de inducir tolerancia mediante mecanismos similares a los descritos antes en los experimentos de bloqueo de coestimuladores. Este concepto es de importancia particular en la incapacidad de respuesta específica generada por el injerto de hígado que, como es un órgano hematopoyético, exporta continuamente gran cantidad de células dendríticas inmaduras.

Los anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD8, que no inducen depleción, privan por completo a las células T de las señales activadoras y de esta manera pueden mantenerlas anérgicas a través de la fijación de antígenos en sus receptores específicos. Estas células anérgicas pueden inducir la falta de respuesta en las células T recién reclutadas ("tolerancia infecciosa") y establecer de tal manera una aceptación específica y permanente de los injertos cutáneos murinos a través de las múltiples barreras de antígenos menores del trasplante o barreras de clase I (Figura 16.14). Se debe señalar que los aloinjertos cutáneos representan la principal dificultad para la inducción de tolerancia y que los trasplantes de órganos como el corazón, que son menos exigentes que la piel, requieren una inmunoterapia menos enérgica.

Debido a la amplia variedad de epítopos peptídicos diferentes presentados por el CMH del injerto, el ataque frontal completo sobre las células T alorreactivas por la administración de péptidos inductores de tolerancia representa un escollo importante, y la estrategia de bloqueo de coestimuladores con los antígenos proporcionados por el injerto propiamente dicho parece constituir un método más promisorio.

¿Es el xenoinjerto una propuesta práctica?

Como la oferta de órganos humanos para trasplantes es bastante inferior a la demanda, se observa un interés creciente en la posibilidad de emplear órganos de animales. Los cerdos son más apropiados que los primates para la donación en lo que respecta tanto a la aceptación ética como a los riesgos de zoonosis. De hecho, las válvulas cardíacas porcinas se han empleado con éxito durante décadas en millones de pacientes en los procedimientos de implantación valvular. Sin embargo, en este caso las válvulas tienen inmunogenicidad muy reducida debido al tratamiento previo con glutaraldehído. Este procedimiento de fijación no puede utilizarse cuando debe trasplantarse un corazón entero u otro órgano funcionante. El primer obstáculo que debe superarse es el **rechazo hiperagudo** por anticuerpos naturales xenorreactivos presentes en el huésped. Los seres humanos, los simios y los monos del Viejo Mundo carecen de la estructura hidrocarbonada galactosa α-1,3-galactosa debido a una mutación en el gen que codifica la α-1,3-galactosiltransferasa en estas especies. En consecuencia, los individuos no son inmunológicamente tolerantes a esta estructura hidrocarbonada no propia. Además, tienen anticuerpos preexistentes contra el epítopo Gal α-1,3-Gal presente en muchas bacterias comunes, que se expresa en concentraciones elevadas en el endotelio vascular del cerdo xenogénico. Los anticuerpos naturales se adhieren al endotelio y activan al complemento en ausencia de reguladores del sistema del complemento humano, como factor acelerador de la degradación, CD59 y MCP (véase la Figura 14.4), lo cual precipita el fenómeno del rechazo hiperagudo. En la Figura 16.15 se reseñan estrategias nuevas de ingeniería genética que permiten solucionar este problema.

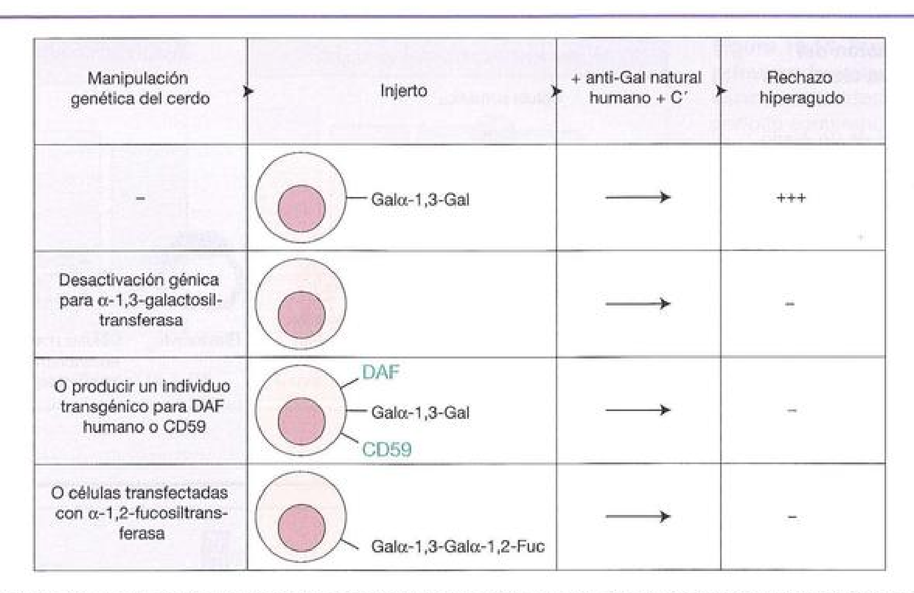


Figura 16.15. Estrategias para evitar el rechazo hiperagudo mediado por complemento de un xenoinjerto causado por la reacción de anticuerpos naturales contra la galactosa con Galα-1,3-Gal sobre la superficie de las células de un injerto procedente de un cerdo.

Los xenoinjertos de corazón o de riñón procedentes de cerdos sometidos a inactivación génica de la α-1,3-galactosiltransferasa pueden funcionar durante un período razonable en los mandriles, de la misma manera que los corazones de cerdos transgénicos que expresan el factor acelerador de la degradación (DAF) de las proteínas reguladoras del complemento humano o CD59. La transfección de las células del cerdo con α-1,2-fucosiltransferasa condujo al "encubrimiento" de la estructura Galα-1,3-Gal con una fucosa terminal y, en consecuencia, evitó la unión de la antigalactosa. Otras estrategias consisten en la transfección con genes que codifican una α-galactosidasa o scFv recombinante intracelular que reacciona con la α-1,3-galactosiltransferasa.

La dificultad siguiente es el **rechazo vascular agudo** que se desarrolla dentro de los primeros 6 días y consiste en la estimulación de la producción de anticuerpos *de novo* en respuesta a los xenoantígenos presentes en el epitelio del donante. La interleucina-12 y el IFNγ inhiben el rechazo vascular agudo de los xenoinjertos y el IFNγ puede proteger al injerto en el largo plazo mediante la estimulación de la formación de NO·, que inhibe la constricción de los vasos sanguíneos. Se obtuvo un grado limitado de éxito con el empleo de mandriles como receptores de corazones o riñones de cerdos sometidos a desactivación génica de la α-1,3-galactosiltransferasa, pero se utilizaron regímenes inmunosupresores bastante potentes, y en el caso de injertos renales se cotrasplantó también tejido tímico con el fin de inducir tolerancia en el receptor.

Incluso aunque se superen los problemas inmunológicos, todavía se debe definir si el xenoinjerto es compatible con la vida humana durante un período prolongado. Otra preocupación es la presencia de los retrovirus endógenos porcinos (PERV) relacionados con los virus que causan leucemia en varias especies. El hecho de que los receptores PAR-1 y PAR-2 de PERV-A tienen una amplia distribución en los tejidos humanos justifica esta preocupación, aunque no está claro si la infección de las células humanas con esos retrovirus puede generar consecuencias deletéreas.

Tratamiento con células madre

El trasplante ideal es el creado **totalmente a partir de células del receptor**, es decir, el autoinjerto, para obviar la necesidad de la inmunosupresión. Es posible aislar células madre (*stem cells*) de varios órganos adultos, como la médula ósea. A modo de ejemplo, se puede señalar que las células madre pluripotentes de la médula ósea humana indujeron la neovascularización terapéutica y la cardiomiogénesis en un modelo de rata con infarto de miocardio. Además, en época reciente se lograron avances en la sustitución de núcleos celulares, que abrió la posibilidad de desarrollar clonación terapéutica de células madre embrionarias (Figura 16.16). En la actualidad, se observa un aumento constante de los conocimientos acerca de los diversos factores de crecimiento necesarios para guiar a las células madre relativamente indiferenciadas hacia la forma madura deseada, como por ejemplo tejido pancreático, células nerviosas o células hepáticas para la terapéutica regenerativa, o eritrocitos para la transfusión.

Un adelanto notable proviene de la clonación de la oveja "Dolly", el primer animal clonado a partir de una célula obtenida de un animal adulto, hace algunos años. Este tipo de clonación reproductiva condujo a considerar que los embriones humanos clonados se podían reimplantar y desarrollar para obtener clones de seres humanos. Sin embargo, en la clonación terapéutica sólo se permite que el embrión crezca durante unos pocos días para convertirse en una fuente de células madre que más tarde se pueden diferenciar y expandir *in vitro*. Un paso importante en este sentido fue el anuncio realizado en 2005 de que un equipo de la Universidad de Newcastle en el Reino Unido había tenido éxito en sus intentos de clonación de un blastocisto humano. En época más reciente, varios

Figura 16.16. Sustitución del núcleo celular para la clonación terapéutica.

Se sustituye el núcleo de un óvulo por el núcleo de una célula somática, como una célula de la glándula mamaria o de la piel. El óvulo es entonces estimulado eléctricamente o con productos químicos para que inicie la división celular. Después de su desarrollo, las células madre pueden ser aisladas y se las induce a desarrollar el tipo celular deseado mediante el cultivo con los factores de crecimiento y diferenciación apropiados.

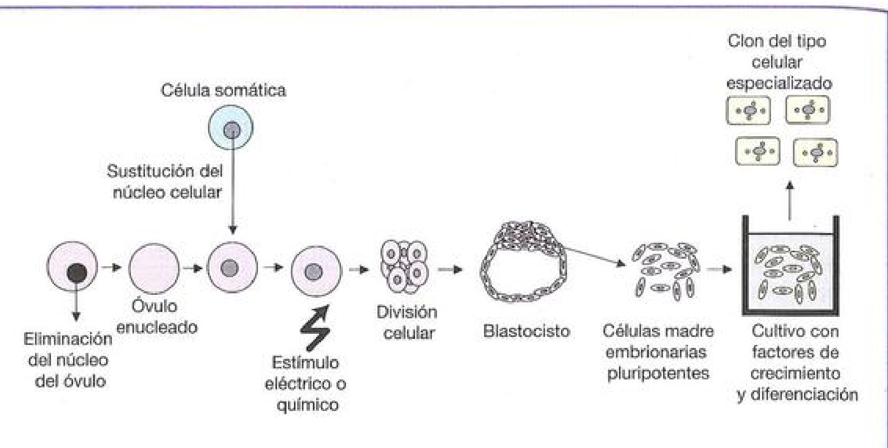
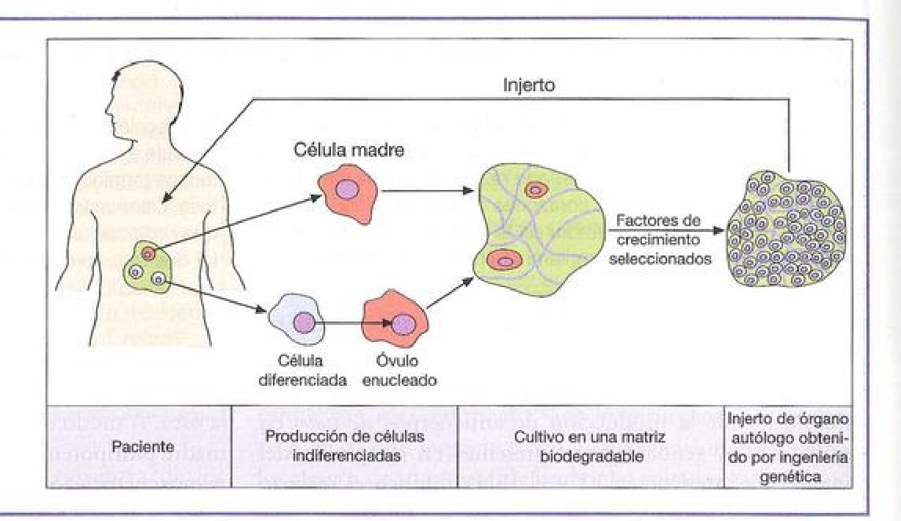


Figura 16.17. Producción de injertos autólogos por ingeniería genética.

Se obtienen células indiferenciadas directamente del paciente, sea como células madre adultas o mediante la sustitución del núcleo de un ovocito enucleado. Estas células se cultivan en una matriz biodegradable con los factores de crecimiento apropiados para obtener un tejido poblado por células diferenciadas que puedan funcionar como un injerto autólogo.



grupos han podido reprogramar genéticamente las células del tejido adulto mediante la introducción de genes que codifican varios factores de transcripción para generar lo que se denominan células madre pluripotentes inducidas. Estas tecnologías poderosas podrían revolucionar el tratamiento de la parálisis y las enfermedades neurodegenerativas, como las enfermedades de Parkinson y de Alzheimer, mediante la transferencia de células neuronales derivadas de células madre. El tratamiento con células madre también es un tema muy investigado para el tratamiento de cardiopatías, diabetes, defectos visuales y muchas otras afecciones. El potencial de crecimiento de las células madre en una matriz diseñada para obtener tejidos o incluso órganos enteros por ingeniería genética ofrece nuevas oportunidades que podrían resolver el problema del rechazo del aloinjerto (Figura 16.17).

El primer trasplante exitoso de un tejido diseñado por ingeniería genética se informó en 2008; en éste se implantó una tráquea del donante tratada con células madre propias del receptor a un paciente con colapso de las vías aéreas como consecuencia de una infección grave por *M. tuberculosis*.

Experiencia clínica en trasplantes

Sitios privilegiados

Los trasplantes de **córnea** sobreviven sin necesidad de inmunosupresión. Como son avasculares, no tienden a sensibilizar al receptor. Esta protección privilegiada aumenta gracias a la producción local de factores inmunosupresores, como TGFβ e IL-1Ra, la expresión limitada del CMH y la presencia estratégica de FasL, que puede inducir la apoptosis de los linfocitos que infiltran el tejido. No obstante, los injertos de córnea pueden sufrir opacificación si el individuo ha sufrido *presensibilización*. Los injertos de **cartílago** también tienen éxito en cierta medida, pero un factor contribuyente adicional es la protección de los condrocitos por la matriz. En el caso del hueso y las arterias, no resulta tan importante que el injerto muera porque aun así proporciona un marco de sostén para la colonización por las células del huésped.

Trasplantes de riñón

Hasta el momento, se han realizado varios miles de trasplantes renales, y gracias a los progresos en el manejo de los

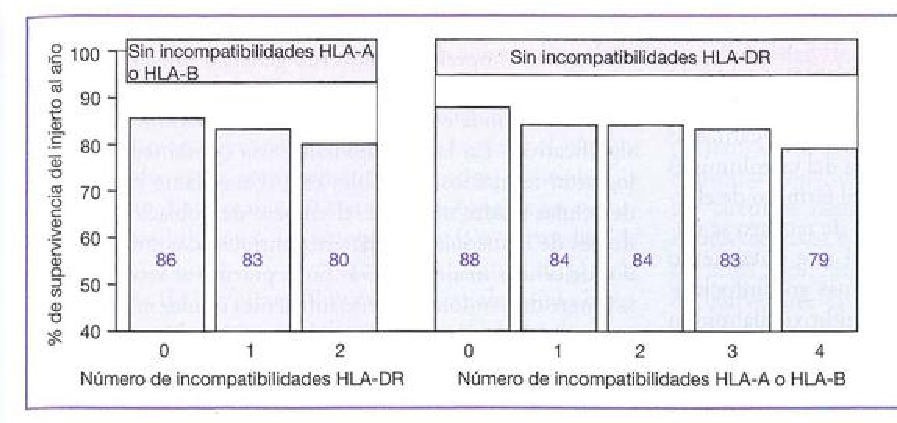


Figura 16.18. Supervivencia de los primeros trasplantes de riñón cadavérico realizados en Europa en un período comprendido entre enero de 1993 y diciembre de 1997 ($n = 12.584$) en función de las incompatibilidades en el HLA-A, el HLA-B y el HLA-DR. Se observa una influencia significativa de la compatibilidad, $p < 0{,}001$, en los dos conjuntos de datos. (Información proporcionada por cortesía de Guido Persijn y Jacqueline Smits de la Eurotransplant International Foundation.)

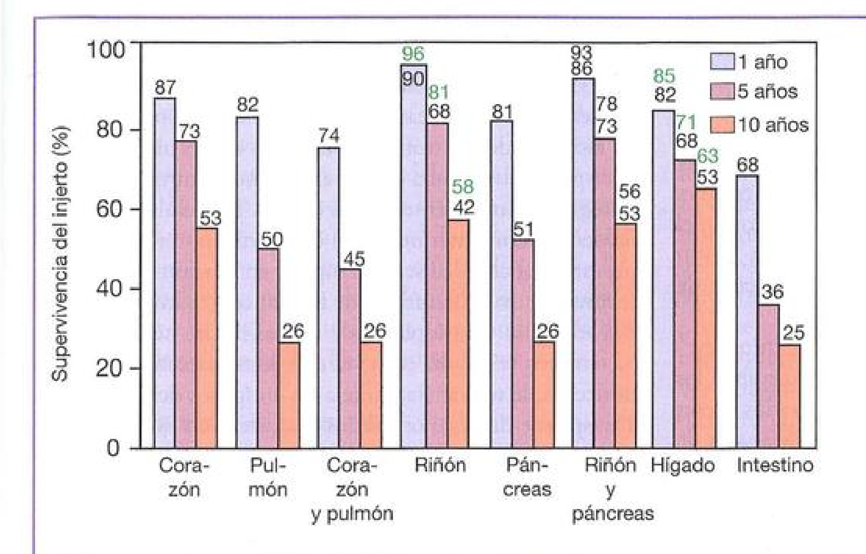


Figura 16.19. Tasas de supervivencia de trasplantes primarios realizados en los Estados Unidos.

En los trasplantes de riñón y de hígado, la cifra superior corresponde a los trasplantes provenientes de donantes vivos, el valor inferior es la situación más común de órganos provenientes de donantes cadavéricos. En el caso de trasplantes combinados de riñón y páncreas, el valor superior corresponde al riñón trasplantado y el valor inferior al páncreas trasplantado. Las tasas de supervivencia para los trasplantes de todos los órganos suelen ser algo más bajas. (Basado en datos del informe anual de la Organ Procurement and Transplantation Network http://optn.transplant.hrsa.gov)

pacientes la tasa de supervivencia es elevada. En el largo plazo (1 año o más) se torna evidente la necesidad de una compatibilidad razonable con los locus del HLA-A, el HLA-B y el HLA-DR (Figura 16.18).

Los pacientes ya están parcialmente inmunosuprimidos en el momento del trasplante porque la uremia causa en cierto grado la falta de respuesta inmunitaria. La **combinación** de dos o tres agentes inmunosupresores, por ejemplo un inhibidor de la calcineurina como la ciclosporina, la azatioprina (que en la actualidad a menudo se sustituye por micofenolato de mofetilo) y un glucocorticoide como prednisolona, es el tratamiento fundamental que permite el mantenimiento del trasplante de riñón en el largo plazo (Figura 16.11). También se investiga el efecto beneficioso de la sinergia entre ciclosporina y rapamicina. En un inicio, estos fármacos se administran en una dosis relativamente alta, la fase de inducción, durante los primeros meses posteriores al trasplante, cuando la respuesta inmunitaria contra el donante está en su etapa más vigorosa, y después, en concentraciones reducidas durante la fase de mantenimiento, que suele requerirse de por vida. Si durante una crisis de rechazo se deteriora la función renal, se puede recurrir a la diálisis renal. Como se señaló antes, hay un gran interés en la posibilidad de realizar xenoinjertos. Cuando el trasplante se lleva a cabo por una glomerulonefritis inducida por inmunocomplejos, el tratamiento inmunosupresor utilizado puede ayudar a prevenir el desarrollo de una lesión similar en el riñón trasplantado. Los pacientes con anticuerpos contra la membrana basal del glomérulo (p. ej., con síndrome de Goodpasture) tienen grandes probabilidades de experimentar la destrucción del trasplante renal, a menos que reciban un tratamiento previo con plasmaféresis y fármacos inmunosupresores.

Trasplantes de corazón

La tasa de supervivencia global del corazón a 1 año del trasplante ascendió hasta una cifra superior al 85% (Figura 16.19), sobre todo gracias a la introducción del tratamiento inmunosupresor combinado. Además del problema del rechazo, es probable que la cantidad de pacientes que se podrían beneficiar con el trasplante cardíaco sea mucho mayor de los que fallecen con corazones adecuadamente sanos. Se debe prestar más atención a la posibilidad de emplear injertos xenogénicos y sustitutos mecánicos.

Trasplantes de hígado

Las tasas de supervivencia de los trasplantes de hígado ortotópicos (en posición normal o habitual) son sólo un poco más bajas que las logradas con los trasplantes cardíacos (Figura 16.19). La capacidad hepatotrófica del tacrolimús es un valor agregado que determina que sea el fármaco de elección para el trasplante hepático. Las crisis de rechazo se tratan con dosis elevadas de corticoides, y si este tratamiento no es eficaz, se deben administrar globulinas antilinfocitos. El empleo de una solución coloidal de hidroxietilalmidón totalmente sintética con lactobionato como sustituto del cloruro permite la conservación del hígado durante 24 horas o más y revolucionó la logística del trasplante hepático. Para mejorar el pronóstico de los pacientes con neoplasias primarias del hígado o los conductos biliares, que se consideraban inoperables, se creó el trasplante de un conjunto de órganos con el hígado como órgano central, por ejemplo, hígado y páncreas, o hígado, páncreas, estómago e intestino delgado o incluso colon. No obstante, hasta en tres cuartas partes de los pacientes que recibieron trasplante por un cáncer de hígado, la evolución no es muy favorable y se observa recurrencia del tumor en el transcurso del primer año. En el futuro, cuando las técnicas de ingeniería genética hayan avanzado en forma suficiente, se intentará la creación de hígados autólogos a partir de células adultas.

La experiencia con trasplantes de hígado entre cerdos reveló un hallazgo inesperado. Muchos animales conservaban los órganos trasplantados en buen estado durante varios meses sin ninguna forma de inmunosupresión y eran incapaces de generar una respuesta contra los injertos de piel o de riñón del mismo donante. La verdadera tolerancia es inducida por las células madre hematopoyéticas intrahepáticas pertenecientes al tipo del donante y por las células dendríticas inmaduras (véase antes), y posiblemente también por el parénquima en sí mismo, que se sabe que produce grandes cantidades de moléculas solubles de clase I del CMH.

En la actualidad, se evalúa la transferencia de hepatocitos aislados unidos a microtransportadores recubiertos de colágeno inyectados por vía intraperitoneal para corregir las deficiencias aisladas, como la deficiencia de la síntesis de albúmina. Este interesante enfoque se puede aplicar en forma más amplia como vehículo general para la terapia génica.

Trasplantes de células madre hematopoyéticas

Los pacientes con ciertas inmunodeficiencias y anemia aplásica son candidatos obvios para el tratamiento con **células madre hematopoyéticas pluripotentes** aisladas a partir de la médula ósea, la sangre periférica o la sangre del cordón; otros candidatos para este tratamiento son los pacientes con leucemia, linfoma, mieloma y cáncer de mama metastásico tratados en forma radical con altas dosis de quimioterapia y en ciertos casos con radioterapia de todo el cuerpo en el intento de destruir las células neoplásicas, como se explicará en el siguiente capítulo.

La médula ósea no sólo contiene células madre hematopoyéticas, sino también células madre mesenquimáticas, que pueden originar cartílago, tendones y hueso; después de su expansión en cultivo hasta un número 5 a 10 veces, estas células las proporcionan un tratamiento excelente a los niños con osteogénesis imperfecta, trastorno genético caracterizado por la presencia de osteoblastos que producen colágeno de tipo I defectuoso con la osteopenia resultante y deformidades óseas significativas. En la inmunodeficiencia combinada grave, se lograron resultados favorables con el trasplante intrauterino de células madre mediante el empleo de poblaciones procedentes de la médula ósea paterna enriquecidas con el marcador de células madre, CD34. En la práctica se reconoció que la sangre del cordón contiene suficientes células madre hematopoyéticas para la sustitución de la médula ósea, pero todavía resulta más conveniente emplear citocinas como factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) a fin de movilizar las células madre del donante fuera de la médula ósea e incrementar la cantidad de células madre en la sangre periférica. El trasplante de células madre autólogas de la sangre periférica (con reinfusión de las células $CD34^+$ tomadas antes de la terapia mieloablativa) o de células madre de sangre periférica alogénicas logra una recuperación más rápida del recuento de neutrófilos y plaquetas que el observado tras el trasplante de médula ósea, y en muchos centros ha remplazado a éste como fuente de esas células. Las células alogénicas pueden experimentar un efecto de injerto contra tumor, aunque esta probabilidad se debe sopesar en función del riesgo de desarrollar una enfermedad de injerto contra huésped (véase más adelante). El trasplante de células madre hematopoyéticas también se estudia cada vez más como mecanismo para la inducción de tolerancia frente a los antígenos del donante en el trasplante de órganos sólidos para crear un estado de quimerismo en el receptor que lleva a la deleción o la inactivación de los linfocitos alorreactivos pertinentes.

Enfermedad de injerto contra huésped como consecuencia de la presencia de células T alogénicas en el injerto

La enfermedad de injerto contra huésped es el resultado del reconocimiento de antígenos del receptor por las células T alogénicas presentes en el inóculo de médula ósea o la sangre periférica y es una complicación grave, a veces mortal, cuya incidencia se reduce si se procede a la depleción previa de las células T con una solución citotóxica de anticuerpos monoclonales contra estas células.

Es de esperar que se logren trasplantes efectivos y se eviten las reacciones de injerto contra huésped después del trasplante de células alogénicas mediante el empleo de estrategias como el bloqueo de coestimuladores (Figura 16.13) sin la necesidad de aplicar el tratamiento citoablativo del injerto o el receptor. Hasta entonces, lo más probable es que los resultados exitosos se deban a donantes altamente compatibles, en particular si se desean evitar reacciones de injerto contra huésped fatales, y en esta situación los hermanos ofrecen las mejores probabilidades. Sin duda, los antígenos del trasplante no HLA menores son importantes y más difíciles de compatibilizar. La enfermedad aguda de injerto contra huésped que se manifiesta dentro de los primeros 100 días después de la infusión de células alogénicas afecta sobre todo la piel, el hígado y el tubo digestivo. Los tratamientos actuales utilizan corticoides como prednisolona combinados

con ciclosporina o tacrolimús, pero se considera que la inclusión de metotrexato en este régimen aumenta su eficacia. La enfermedad de injerto contra huésped crónica (o sea, después de los primeros 100 días) se asocia con un pronóstico relativamente favorable si se limita a la piel y el hígado, pero cuando están comprometidos órganos múltiples, la evolución es desfavorable. El tratamiento consiste en ciclosporina y prednisolona. La patogenia de la enfermedad de injerto contra huésped podría asociarse en primer lugar a la secreción de IL-1, TNF e IFNγ proveniente del tejido huésped dañado, con activación de las células Th1 del donante por las células dendríticas tanto del donante como del receptor para que secreten IL-2 e IFNγ. El huésped soporta el ataque de las células T citotóxicas y las células NK del donante a través de las vías Fas-FasL y perforina/granzima que inducen la muerte celular por apoptosis, lo cual es reforzado por la producción de TNF. Es presumible que las células Treg $Foxp3^+$ $CD4^+CD25^+$ se puedan emplear para limitar este proceso, y en la actualidad se están realizando experimentos en modelos animales para evaluar la eficacia de estos enfoques. En uno de estos modelos, los ratones tratados con anticuerpos monoclonales anti-IL-21 mostraron menor mortalidad por la enfermedad injerto contra huésped que se asoció con aumento de células Treg inducibles $Foxp3^+$ en la lámina propia del colon. Así, el bloqueo de IL- 21 en vivo llevó a la inducción de Treg antes que la diferenciación de células Th l y Th17 inducida por IL-21.

Otros órganos y tejidos

Es de esperar que los adelantos en las técnicas de control del proceso de rechazo alienten la realización de trasplantes en otras áreas, como la diabetes tipo I, en la que el número de trasplantes registrados aumenta con rapidez. En la actualidad, la tasa de supervivencia a los 5 años del trasplante simultáneo de páncreas y riñón es de alrededor del 75% (Figura 16.19). El trasplante de células aisladas de islotes es una opción más interesante que evita la necesidad de una cirugía mayor y parece requerir menos inmunosupresión que la necesaria después del trasplante de páncreas. Se inyecta colagenasa en el conducto pancreático de un donante con muerte encefálica y los islotes recuperados se purifican por centrifugación según el gradiente de densidad. Estos islotes se infunden luego en la vena porta hepática del receptor, desde donde se dirigen hacia los sinusoides hepáticos. En época reciente, este procedimiento se extendió con éxito al empleo de islotes aislados de un fragmento de páncreas extirpado de un donante vivo. Los beneficios del trasplante de células de los islotes como alternativa a la inyección de insulina deben ser superiores, por supuesto, a los riesgos de la inmunosupresión requerida.

La tasa de supervivencia del trasplante de pulmón y el trasplante simultáneo de corazón y pulmones a los 5 años oscilaba entre el 45 y el 50% y está en ascenso, pero aún no se puede considerar satisfactoria (Figura 16.19). El trasplante de intestino también debe mejorar, ya que la tasa de supervivencia actual a los 5 años es del 36% (Figura 16.19). Es previsible que en el futuro el trasplante de piel en el caso de quemaduras muy graves se convierta en un procedimiento habitual. El injerto de **tejido nervioso** podría beneficiar a los pacientes con enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y los accidentes cerebrovasculares. De hecho, el trasplante de tejido mesencefálico de fetos humanos en el cerebro de pacientes con enfermedad de Parkinson demostró que las neuronas dopaminérgicas de ese tejido se podían integrar a los circuitos neuronales cerebrales. En algunos pacientes, incluso se pudo suspender el tratamiento con L-dopa durante varios años. Sin embargo, este tipo de trasplante está lejos de convertirse en un tratamiento habitual y los resultados obtenidos en los ensayos clínicos son muy variables. Como se mencionó, los investigadores intentan evaluar las células madre como fuente de neuronas, pero todavía deben analizar con mayor detalle los factores de crecimiento óptimos y las condiciones de cultivo necesarias para generar tipos específicos de neuronas.

Plantea gran preocupación la esterilidad, que incluye la secundaria a intervenciones médicas como tratamiento citotóxico de pacientes con cáncer. Por lo tanto, resulta gratificante escuchar la existencia de embarazos exitosos en mujeres que han recibido trasplantes de ovarios. La crioconservación de espermatozoides es una estrategia eficaz en el tratamiento del cáncer en varones adultos que desean proteger los espermatozoides del tratamiento mutágeno anticanceroso. Este método no se puede aplicar en varones prepúberes, pero se cuenta con una alternativa que consiste en la crioconservación de las células madre espermatogonias para volver a infundirlas después del tratamiento, cuando las células de Sertoli que inducen su diferenciación en espermatozoides maduros funcionen con normalidad. Es posible identificar y corregir defectos genéticos en las espermatogonias antes de introducirlos nuevamente en el organismo, pero los comités de ética se oponen a esta reparación al estilo "Frankenstein". Un método que resulta más aceptable en caso de esterilidad masculina secundaria a una disfunción de las células de Sertoli es el desarrollo de espermátides maduros mediante el cultivo de espermatogonias con células de Sertoli provenientes de un individuo normal.

La cirugía de derivación coronaria (bypass coronario) consiste en el autoinjerto de la vena safena de la pierna, la arteria mamaria interna o la arteria radial del brazo. El vaso sanguíneo se trasplanta en el corazón para sortear un bloqueo o una lesión de una arteria coronaria. Los injertos vasculares que se realizan en otras zonas del cuerpo pueden emplear vasos sanguíneos sintéticos compuestos por materiales como Dacron® o politetrafluoroetileno (PTFE), autoinjertos o, en casos muy ocasionales, aloinjertos. En este momento se intenta la creación de vasos sanguíneos por ingeniería genética, por ejemplo, mediante el empleo de células madre humanas cultivadas en estructuras poliméricas recubiertas por fibronectina en presencia de los mediadores apropiados, como el factor de crecimiento del endotelio vascular.

El feto es un aloinjerto potencial

Una consecuencia del polimorfismo en una población exogámica es que la madre y el feto casi con certeza tienen CMH diferentes. En la placenta hemocoriónica humana, la

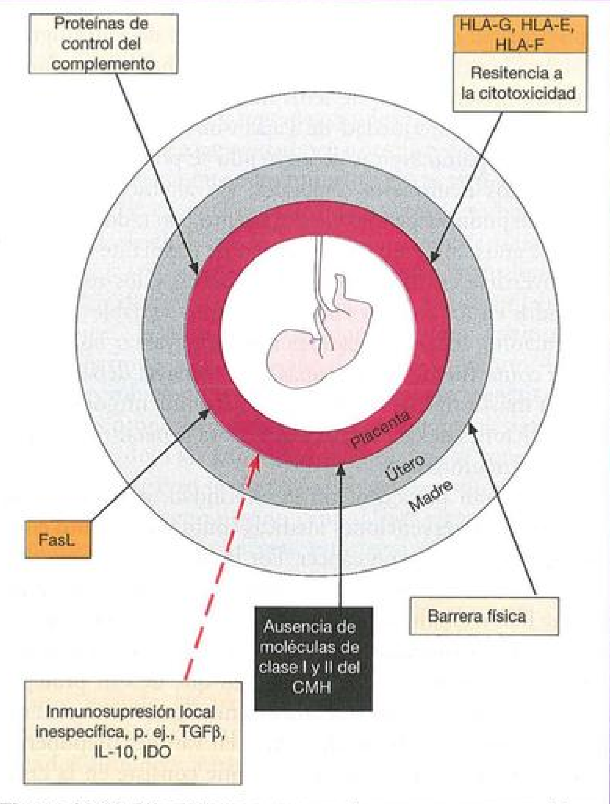


Figura 16.20. Mecanismos propuestos como responsables de la supervivencia del feto como aloinjerto en la madre.

DO, indolamina 2,3-dioxigenasa.

sangre materna con linfocitos inmunocompetentes circula en contacto con el trofoblasto fetal y es importante explicar la forma en que el feto evita el rechazo del aloinjerto a pesar de que en un porcentaje de las madres se desarrolla una respuesta inmunitaria que se evidencia por el hallazgo de anticuerpos anti-HLA y linfocitos citotóxicos. De hecho, la sensibilización previa por un injerto cutáneo no afecta el embarazo, lo que demuestra que las células del trofoblasto están inmunológicamente protegidas; en realidad, son resistentes a la mayoría de los mecanismos citotóxicos, aunque resultan susceptibles a las células NK activadas por IL-2. En la Figura 16.20 se resumen algunas de las muchas especulaciones sobre este tema.

Sin duda, el factor más importante es la ausencia bien documentada de antígenos convencionales de clase I y de clase II del CMH en el sinciciotrofoblasto y el citotrofoblasto placentarios que protegen al feto del ataque alogénico. Estos cambios fundamentales en la regulación de los genes del CMH también determinan la expresión singular de las proteínas no clásicas HLA-G, HLA-E y HLA-F en el citotrofoblasto extravelloso. Estas moléculas, que revelan un polimorfismo muy limitado (hasta octubre de 2010 se describieron 9, 21 y 46 variedades de secuencias proteicas para HLA-E, HLA-F y HLA-G, respectivamente, comparados con los 1.381, 1.927 y 960 alelos para HLA-A, HLA-B y HLA-C, respectivamente [véase la Figura 16.9]), podrían proteger al trofoblasto de su destrucción por las células NK del endometrio uterino, que en condiciones normales atacarían a las células carentes de moléculas de clase I del CMH. En el 20% de los primeros embarazos se detecta IgG materna contra el CMH paterno, y esta cifra se eleva hasta el 75-80% en las mujeres multíparas. Algunos de esos anticuerpos reaccionan en forma cruzada con el HLA-G, pero la vulnerabilidad de las células del trofoblasto al ataque del complemento es inhibido por la presencia de proteínas de control sobre su superficie que inactivan a la C3 convertasa. En los ratones en los que se desactivó el gen para la proteína reguladora del complemento Crry, se observó inflamación placentaria y muerte fetal. El análisis inmunohistoquímico reveló el depósito de componentes del complemento en la placenta, pero si estos ratones se cruzan con otros individuos sometidos a la desactivación del componente C3 del complemento, se anula el efecto deletéreo de la ausencia de Crry. Esto indica con claridad que la inhibición de la activación del complemento es uno de los mecanismos que contribuyen a mantener al feto semialogénico, al menos en los ratones. La presencia del ligando Fas en la interfase maternofetal del trofoblasto podría limitar la agresión inmunitaria del feto, aunque el hecho de que el ratón *gld*, que carece de FasL, y el ratón *lpr*, que carece de Fas, tengan crías vivas sugiere que este mecanismo no es esencial para el mantenimiento de la preñez. También se produce una inhibición de la actividad de las células T, las células B y las células NK a través de la generación de metabolitos tóxicos del triptófano por la enzima catabólica 2,3-dioxigenasa, presente en las células trofoblásticas y en los macrófagos.

Las citocinas parecen cumplir una función compleja en el embarazo implantado, lo cual se evidencia por la producción de factores de crecimiento como CSF-1 y GM-CSF, que ejercen una influencia trófica sobre la placenta, y de factor de crecimiento transformador β (TGFβ), que podría ayudar a amortiguar la activación de las células NK generada por fenómenos potencialmente abortivos como la exposición intrauterina al lipopolisacárido (LPS) o los interferones. En realidad, la producción de las sustancias inmunosupresoras IL-10 y TGFβ por las células T reguladoras podría cumplir una función fundamental en la limitación del ataque inmunitario del feto. El número de células con características de las células T reguladoras naturales, es decir, $CD4^+ CD25^+ CTLA\text{-}4^+ GITR^+ FoxP3^+$, aumenta tanto en la circulación como en la decidua durante el primero y el segundo trimestre del embarazo humano. Se demostró que la ausencia de estas células T reguladoras en el ratón estimula el rechazo del feto mediado por mecanismos inmunológicos.

El rechazo del injerto es una reacción inmunitaria

- El rechazo muestra especificidad, la respuesta de segundo tipo es enérgica, está mediada por linfocitos y se forman anticuerpos específicos contra el injerto.

Control genético de los antígenos del trasplante

- En todas las especies de vertebrados, hay un complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) del cual dependen las reacciones más intensas contra los injertos.
- Los antígenos del CMH de los progenitores se expresan en forma codominante sobre las superficies celulares.
- Los hermanos tienen una posibilidad de 1:4 de poseer CMH idénticos.

Otras consecuencias de la incompatibilidad del CMH

- Las moléculas de clase II del CMH provocan una reacción linfocítica mixta con proliferación y transformación blástica cuando interactúan linfocitos genéticamente diferentes.
- Las diferencias de las moléculas de clase II son responsables en gran medida de la reacción de los linfocitos del injerto tolerado contra los antígenos del huésped (reacción de injerto contra huésped).

Mecanismos del rechazo de injerto

- Los anticuerpos preformados generan un rechazo hiperagudo en el transcurso de minutos.
- Los linfocitos CD8 y CD4, la inmunoglobulina y el complemento cumplen una función fundamental en el rechazo agudo que puede producirse varios días después del trasplante.
- La intensidad del rechazo del aloinjerto depende de la presencia de una cantidad sorprendentemente grande de células precursoras aloespecíficas que reconocen en forma directa al alo-CMH (vía directa); el rechazo más tardío se debe a péptidos alogénicos presentados por el CMH propio (vía indirecta).
- El rechazo crónico puede aparecer meses o años después del trasplante y pueden participar los linfocitos, los fagocitos, los anticuerpos con intervención del complemento o sin él.

Prevención del rechazo de injerto

- El riesgo de rechazo se puede reducir al mínimo si se realiza la compatibilización del donante y el injerto en cuanto al grupo ABO y a los tipos de CMH de los tejidos. Los antígenos del CMH se tipifican mediante técnicas serológicas o de genética molecular. Las compatibilizaciones de HLA-DR, HLA-A y HLA-B son los más importantes.
- Los agentes que producen inmunosupresión general, como los fármacos antimitóticos (p. ej., azatioprina), los antiinflamatorios esteroides y los anticuerpos monoclonales antilinfocíticos pueden bloquear el rechazo de injerto. La ciclosporina, el tacrolimús y la rapamicina son los fármacos específicos para las células T; los complejos formados por la ciclosporina y el tacrolimús con sus ligandos celulares (ciclofilina A y FKBP, respectivamente) bloquean a la calcineurina, una fosfatasa que activa al factor de transcripción de IL-2 NFAT, mientras que la rapamicina (que también forma complejos con FKBP) inhibe a la TOR cinasa comprometida en la proliferación celular.
- Se puede lograr la depresión específica del antígeno a través de la inducción de tolerancia mediante la inyección de médula ósea alogénica con bloqueo de coestimuladores por anticuerpos anti-CD154 (CD40L) combinados con la proteína de fusión CTLA-4-Ig. Los precursores de las células dendríticas también pueden inducir tolerancia a través de la presentación de antígenos sin coestimuladores B7.

Xenoinjerto

- Se están desarrollando estrategias para prevenir el rechazo hiperagudo de los injertos de cerdo en humanos debido a la reacción de anticuerpos naturales en el huésped con epítopos galactosa α-1,3-galactosa en células de cerdo y rechazo vascular agudo por anticuerpos adquiridos por la respuesta de anticuerpos xenogénicos.

Terapia con células madre

- Se han aislado células madre de varios tejidos adultos que tienen el potencial de proporcionar material para los autoinjertos.
- La introducción de factores de protección en células adultas puede usarse para generar células madre pluripotenciales.

Experiencia clínica en injertos

- Los injertos de córnea y de cartílago son avasculares, producen factores inmunosupresores locales y son comparativamente bien tolerados.
- Los injertos renales dan excelentes resultados y son los más usados, aunque la inmunosupresión en general debe continuar toda la vida.
- También se están alcanzando altas tasas de éxito con los trasplantes cardíacos y hepáticos, especialmente gracias a la ciclosporina. Los trasplantes de pulmón tienen menos éxito. Se están usando cada vez más los trasplantes de células pancreáticas para los pacientes diabéticos tipo 1.
- Los injertos de células madre hematopoyética para anemia inmunodeficiencias y anemia aplásica están aceptados para hermanos compatibles, pero es difícil evitar la enfermedad de injerto versus huésped con células madre alogénicas sin primero purgar los linfocitos T o inducir tolerancia usando bloqueo coestimulador. En lugar de la médula ósea pueden usarse las células madre hematopoyéticas asiladas de sangre periférica después de la movilización de estas células de la médula ósea usando G-CSF.
- Ha habido cierto éxito en el trasplante de tejido neural en pacientes con enfermedad de Parkinson.
- Los intentos de ingeniería tisular como el de la tráquea tienen cada vez más éxito.

El feto como aloinjerto

- Las diferencias entre el complejo mayor de histocompatibilidad de la madre y del feto implica que, como potencial injerto, el feto debe quedar protegido contra al ataque de la madre.
- Uno de los principales mecanismos de defensa es la falta de antígenos CMH clase I y II en la interfase materno fetal.
- La placenta expresa proteínas CMH no clásicas clase I, HLA-G, HLA-E y HLA-F, que pueden actuar inhibiendo la citotoxicidad por células NK maternas.

- Las células tropoblásticas tienen proteínas del complemento en la superficie que degradan C3 convertasa y bloquean cualquier daño mediado por el complemento.
- La producción local de IL-10 y TGFβ por las células reguladoras CD4+CD25+Foxp3+, la degradación del triptófano por la indolamina 2,3-dioxigenasa, y la presencia de FasL pueden contribuir con la supresión de las reacciones indeseables.

LECTURAS ADICIONALES

Al-Khaldi A. & Robbins R.C. (2006) New directions in cardiac transplantation. Annual Review of Medicine 57, 455–471.

Austen K.F., Burakoff S.J., Rosen F.S. & Strom T.B. (eds.) (2001) Therapeutic Immunology, 2nd edn. Blackwell Science, Oxford.

Cornell L.D., Smith R.N. & Colvin R.B. (2008) Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. Annual Review of Pathology 3, 189–220.

Kaplan B., Burkhart, G., Lakkis F.G. & Morris R. (eds.) (2011) Immunotherapy in Transplantation: Principles and Practice. Wiley-Blackwell, Oxford.

Kiskinis E. & Eggan K. (2010) Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. The Journal of Clinical Investigation 120, 51–59.

Prabhakaran S., Humar A. & Matas A.J. (2008) Immunosuppression: use in transplantation. In Encyclopedia of Life Sciences John Wiley & Sons, Ltd., Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001242.pub2

Sayegh M.H. & Carpenter C.B. (2004) Transplantation 50 years later—progress, challenges, and promises. New England Journal of Medicine 351, 2761–2766.

Shimabukuro-Vornhagen A., Hallek M.J., Storb R.F. & von Bergwelt-Baildon M.S. (2009) The role of B-cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. Blood 114, 4919–4927.

Starzl T.E. (2004) Chimerism and tolerance in transplantation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 101, 14607–14614.

Trowsdale J. & Betz A.G. (2006) Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. Nature Immunology 7, 241–246.

Turka L.A. & Lechler R.I. (2009) Towards the identification of biomarkers of transplantation tolerance. Nature Reviews Immunology 9, 521–526.



CAPÍTULO 17
Inmunología tumoral

Conceptos clave

A modo de resumen...

En los capítulos anteriores, describimos cómo se activa el sistema inmunitario en respuesta a los agentes infecciosos y cómo monta una respuesta adecuada por medio de una combinación de los componentes innato y adaptivo. Para la iniciación de una respuesta inmunitaria robusta, es fundamental la detección de lo no propio, en un comienzo en la forma de patrones moleculares asociados con el patógeno (PAMP) que son detectados a través de la unión de los receptores de reconocimiento de patrón (PRR) solubles o celulares sobre los macrófagos, las células dendríticas y otras células del sistema inmunitario. La activación de las células dendríticas mediada por PAMP activa su maduración y la migración ulterior hacia los ganglios linfáticos, donde desempeñan una función fundamental como células presentadoras de antígeno; esto le permite a las células T responder a los determinantes no propios en la forma de péptidos extraños. Las células T activadas productivamente se diferencian de células efectoras, que coordinan las respuestas de células B, la activación de los macrófagos y la muerte por células citotóxicas, además de otras funciones. De esta manera, ambas ramas del sistema inmunitario, innata y adaptativa, trabajan de modo cooperativo para identificar y hacer frente a los microorganismos. El sistema inmunitario evolucionó para discriminar los elementos propios de los que no lo son de acuerdo con el principio pragmático de que todo lo reconocido como no propio podría ser peligroso y, en consecuencia, se justifica su expulsión del organismo. En la búsqueda implacable de elementos extraños, a menudo nuestros sistemas inmunitarios, bien intencionados, actúan contra nosotros mismos. Un ejemplo de ello es el rechazo de los órganos trasplantados, pero también hay situaciones en las que elementos propios pueden generar problemas graves, con el cáncer como ejemplo fundamental de esta circunstancia.

Roitt's Essential Immunology, Twelfth Edition. Peter J. Delves, Seamus J. Martin, Dennis R. Burton, Ivan M. Roitt.

Introducción

Como veremos en este capítulo, un problema muy importante con el cáncer es que el sistema inmunitario actúa poco en términos de reconocer estas entidades como potencialmente peligrosas, en gran medida debido a la preocupación del sistema inmunitario con el reconocimiento de lo no propio, y por esta razón, de modo característico, las respuestas inmunitarias contra los tumores son modestas. Es probable que esto tenga mucho que ver con la falta de los PAMP, que normalmente son necesarios para iniciar respuestas inmunitarias poderosas, pero también puede deberse a la manipulación del sistema inmunitario por el tumor. De hecho, cada vez hay más pruebas de que los tumores con frecuencia reclutan macrófagos, así como otras células del sistema inmunitario innato, y "reeducan" a estas células hacia un fenotipo para la curación de heridas a los fines de favorecer el crecimiento y la supervivencia del tumor. Antes de ver las razones por las que las poblaciones celulares transformadas (es decir, cancerosas) no son reconocidas fácilmente y son eliminadas por el sistema inmunitario, en primer lugar revisaremos los factores que influyen en el desarrollo del cáncer.

Transformación celular y cáncer

El cáncer no es una enfermedad única, sino que representa un amplio espectro de entidades causadas por el fracaso de los controles que, en condiciones normales, rigen la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de las células. Los cánceres pueden ser **benignos**, cuando no se diseminan a otros tejidos, o **malignos**, cuando son invasivos y se diseminan a otros tejidos del cuerpo. Las células que sufren **transformación maligna** escapan de los controles normales del crecimiento, invaden los tejidos circundantes y, por último, pueden migrar a otros sitios del organismo para establecer tumores secundarios.

Mientras que las primeras teorías sobre la naturaleza del cáncer propusieron que el crecimiento celular anormal era causado por agentes infecciosos como los virus, estas teorías fueron gradualmente suplantadas por la idea de que el cáncer era causado por **mutágenos**; agentes que provocan la mutación genética. En la actualidad, se acepta que la mayoría de los carcinógenos (es decir, agentes causantes de cáncer) actúan a través de provocar **daño al DNA**, en forma directa o indirecta. Ese daño puede ser relativamente sutil y dar por resultado mutaciones que alteran un único aminoácido en la proteína codificada por el gen afectado, o más espectacular y provocar la translocación de segmentos cromosómicos enteros de un cromosoma a otro (Figura 17.1).

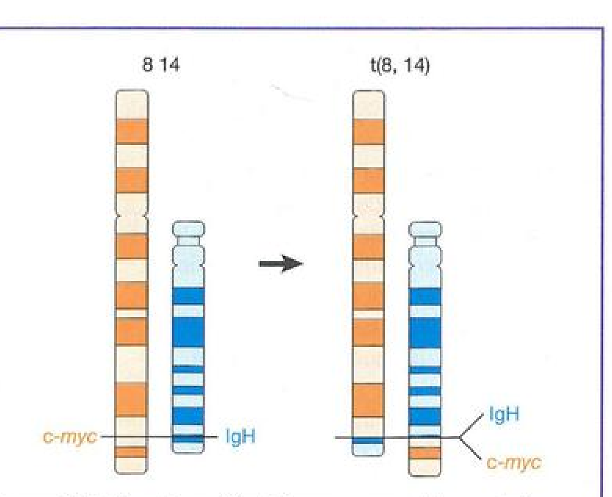


Figura 17.1. Translocación del gen c-*myc* al locus de la cadena μ en el linfoma de Burkitt.

El linfoma de Burkitt es una neoplasia de células B que se desarrolla con una incidencia relativamente elevada en los niños africanos y se asocia con EBV; en la mayoría de los casos que se estudiaron, el gen c-*myc*, localizado en la banda q24 del cromosoma 8, se une para una translocación recíproca con el gen de la cadena μ sobre la banda q32 del cromosoma 14, como se describió. Se considera que los mecanismos normales que inhiben c-*myc* no pueden operar en el gen translocado y la célula perpetúa su presencia en el ciclo celular. Con menor frecuencia, c-*myc* se transloca hacia el sitio de los loci κ (cromosoma 2) o λ (cromosoma 22).

Los resultados de estos sucesos mutágenos suelen tener pocas consecuencias, ya que el daño del DNA es reparado o la célula es eliminada por medio de la apoptosis. Sin embargo, en una pequeña minoría de casos los sucesos mutágenos pueden producir células con propiedades que les permite desobedecer las reglas que normalmente rigen el comportamiento celular en los organismos multicelulares. Pero esto no sucede de manera repentina, dado que las barreras para la transformación maligna son formidables. Es importante destacar que **los cánceres casi nunca surgen de lesiones genéticas sino, en cambio, progresan en una serie de pasos desde un estado inalterado normal a uno totalmente transformado** (Figura 17.2); con frecuencia, la adquisición de mutaciones anteriores predispone a adquirir mutaciones adicionales por la generación de inestabilidad del DNA. Esta progresión es facilitada a través de la adquisición gradual y aleatoria de una serie de mutaciones que cooperan para producir el estado canceroso. Dadas las presiones de selección diferentes que actúan en los distintos tejidos, se observan combinaciones diferentes de mutaciones en los cánceres que se originan en los variados tipos tisulares. Además, aunque algunos de los mismos genes fundamentales (como *P53, RAS, MYC, PTEN, RB*) con frecuencia están mutados en la gran mayoría de los cánceres, estas mutaciones pueden ser acompañadas por una amplia gama de mutaciones adicionales que pueden ser relativamente exclusivas para un tumor individual.

La transformación celular es un proceso de múltiples pasos

La transformación celular es un proceso de múltiples pasos y comprende una combinación de lesiones genéticas

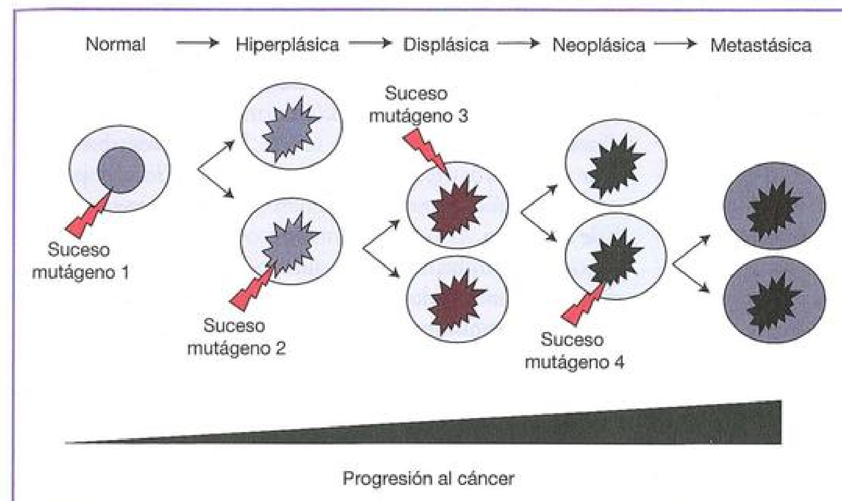


Figura 17.2. El desarrollo del cáncer es un proceso que se realiza en varios pasos.

Los cánceres rara vez se originan de mutaciones únicas, sino que se producen como resultado de la adquisición de una serie de mutaciones que progresivamente transforman una célula normal una maligna anormal. En cada paso de la progresión, las células transformadas adquieren características (p. ej., la capacidad de crecer en forma independiente de los factores de crecimiento, la resistencia a la apoptosis, la capacidad de invadir los tejidos circundantes) que les confieren ventajas competitivas respecto de las células vecinas.

que afectan a los genes que regulan el ingreso en el ciclo celular, la salida del ciclo celular y la muerte de la célula (apoptosis). A menudo, el cáncer se asocia con **mutaciones activadoras** en genes que promueven la proliferación celular, como *MYC* y *RAS*, que conducen a un aumento de la actividad, la estabilidad o la expresión de los productos proteicos de esos genes. Éstos, que en su estado hiperactivo favorecen el desarrollo del cáncer, se denominan **oncogenes**. Además, con frecuencia se observan **mutaciones inactivadoras** o **mutaciones interferentes dominantes** (es decir, mutaciones que generan una proteína que ha perdido su función normal y también puede inhibir la actividad de cualquier proteína de tipo original remanente) en genes que promueven la detención del ciclo celular o la apoptosis de las células dañadas; *P53* y *RB* son los principales ejemplos. Estos últimos se denominan **genes supresores tumorales** porque, en su forma original, sus productos actúan oponiéndose al desarrollo del cáncer. La expresión desregulada de los genes que intervienen en el control de la muerte celular programada (como *BCL-2* o *ABL*) es también una característica habitual de muchas neoplasias malignas.

Así, el **cáncer surge como consecuencia de una combinación de mutaciones génicas** que afectan los oncogenes y los genes supresores tumorales y, como consecuencia, es un fenómeno con baja probabilidad. De hecho, si se tiene en cuenta los tres mil millones de células que en promedio produce un ser humano en su vida, nuestros cuerpos están extraordinariamente bien adaptados para limitar la producción de células que logran escapar de los controles normales que rigen la proliferación celular. Ahora bien, si se tienen en cuenta los casi 80 años de vida promedio de un ser humano, el cáncer afecta a un porcentaje significativo de individuos. Analizaremos ahora algunos de los factores que afectan la incidencia del desarrollo del cáncer.

La incidencia del cáncer varía en los diferentes tejidos

Los cánceres pueden surgir prácticamente en cualquiera de los tejidos del cuerpo, si bien se encuentran con mayor frecuencia los producidos a partir de los epitelios (las láminas de células que forman la capa superior de la piel y que revisten las paredes de cavidades dentro del organismo). Los cánceres que surgen de los epitelios se denominan **carcinomas** y estos tumores dan cuenta de más del 80% de todas las muertes relacionadas con el cáncer en el mundo occidental.

Es probable que esto último se relacione con dos factores: en primer lugar, los epitelios son los que tienen el máximo riesgo de exposición a los agentes que causan cáncer (**carcinógenos**) porque estas células revisten las superficies del cuerpo que están en contacto directo con el medioambiente (p. ej., la piel, los pulmones, la boca, el esófago, el estómago, el intestino, las vías urinarias, el cuello uterino), fuente muy importante de carcinógenos, que pueden ser de naturaleza química, física o biológica. El otro factor importante que rige la alta probabilidad de cáncer que se origina del epitelio se debe a la tasa elevada de sustitución de las células epiteliales, como consecuencia del daño o la infección, lo que significa que estas células están en constante división. Con mayor frecuencia, los cánceres surgen en los tejidos que exhiben una tasa elevada de mitosis, tal vez porque estas células ya están dividiéndose a una tasa relativamente alta y las barreras a la división celular son inferiores que en los tejidos que no se dividen (es decir, posmitótica). Dado que las células en división necesitan replicar sus genomas, un proceso que por sí puede ser una fuente de mutación debida a errores cometidos por la DNA polimerasa, estas células pueden ser una fuente de inestabilidad genética.

Los tumores malignos restantes surgen de los tejidos no epiteliales de todo el cuerpo. Los que surgen de los diferentes tejidos conectivos, denominados **sarcomas**, determinan el 1% de los tumores encontrados en los cánceres clínicos. El segundo grupo de tumores de origen no epitelial surge de los distintos tipos de células que constituyen los tejidos formadores de la sangre (es decir, hematopoyéticos) y son la células del sistema inmunitario. Estos tumores, denominados **neoplasias hematopoyéticas**, incluyen **las leucemias y los linfomas** y representan alrededor del 17% de los fallecimientos por cáncer. El grupo final de los tumores no epiteliales, que surgen de varios de los componentes centrales (es decir, cerebro) y los sistemas nerviosos periféricos (es decir,

médula espinal y tejido de nervio de revestimiento), se denomina **tumores neuroectodérmicos**. Éstos representan alrededor del 2,5% de los fallecimientos por cáncer.

De acuerdo con el tejido en el que se originan y el estadio en que se encuentran las células en el momento de la transformación, los cánceres pueden crecer con lentitud o, en cambio, rápidamente; pueden ser poco metastásicos o muy invasores, y algunos cánceres son relativamente sensibles al tratamiento, mientras que otros son resistentes incluso a los regímenes más prolongados. El tratamiento anticanceroso típico comprende la cirugía (para los tumores sólidos) seguido por la administración de fármacos citotóxicos o de radiación, sea en forma aislada o en combinación, para destruir las células errantes al tiempo que se trata de respetar tantas células normales (no malignas) como sea posible. Es esta última consideración la que de modo característico establece la cantidad de radiación o de fármacos citotóxicos que puede utilizarse en la esperanza de erradicar la carga tumoral.

Los agentes mutágenos, que incluyen los virus, pueden provocar transformación celular

Como se mencionó, con mayor frecuencia el cáncer surge como resultado de mutaciones que afectan a los genes que regulan las tasas de mitosis, la apoptosis y otras funciones celulares. Prácticamente todos los carcinógenos son agentes mutágenos, es decir, agentes que causan mutaciones génicas. Por lo tanto, los tejidos que suelen experimentar los niveles más altos de exposición a los carcinógenos son también los que tiene el riesgo más alto de mutación. Dado que los tejidos epiteliales están expuestos continuamente a sustancias que pueden contener carcinógenos (p. ej., el aire que respiramos, los alimentos que comemos, los líquidos que bebemos, los virus con los que nos encontramos), se deduce que las células en estos tejidos presentan el riesgo mayor de adquisición de mutaciones que pueden resultar en cáncer. Sin embargo, debido a la detección del daño del DNA y los mecanismos de reparación, así como de los mecanismos para limitar la capacidad de las células anormales para replicarse (incluida la simple eliminación de estas células por apoptosis y la inducción de un estado de falta de replicación denominado **senescencia**), es importante tener en cuenta que la gran mayoría de mutaciones no producen cáncer. No obstante, cuando surgen los cánceres, se encuentran con mayor frecuencia en los tejidos epiteliales porque, como ya se mencionó, éstos tienen el máximo riesgo de daño o de infección.

Los virus también pueden causar cáncer a través de la inserción en el genoma de sus huéspedes. Esto puede causar cáncer por dos mecanismos diferentes: en primer lugar, el genoma viral puede portar un gen que le permite a la célula huésped escapar de los controles normales que limitan la división celular, su duración o ambas y, en segundo lugar, el virus puede integrar su genoma cerca de un gen del huésped que regula la proliferación, la apoptosis o ambas, y esto pueden dar como resultado la expresión aberrante de dichos genes.

Mecanismos celulares intrínsecos de supresión tumoral

Dado que el crecimiento descontrolado de las células es una fuerza potencialmente destructiva, hay un número de sistemas celulares intrínsecos "a prueba de fallos" que sirven para reducir la probabilidad de que se produzca la transformación celular (Figura 17.3). Estos sistemas entran en acción cuando se generan señales anormales dentro de las células y normalmente las "castigan" privándolas de la posibilidad de dividirse (de manera transitoria en algunos casos o permanente en otros) o al destruirlas en forma absoluta. Ahora analizaremos algunos de estos mecanismos naturales de limitación del cáncer.

Los factores de crecimiento son esenciales para la división celular

Uno de los límites más importantes sobre la proliferación es que todas las células normalmente requieren señales pro-

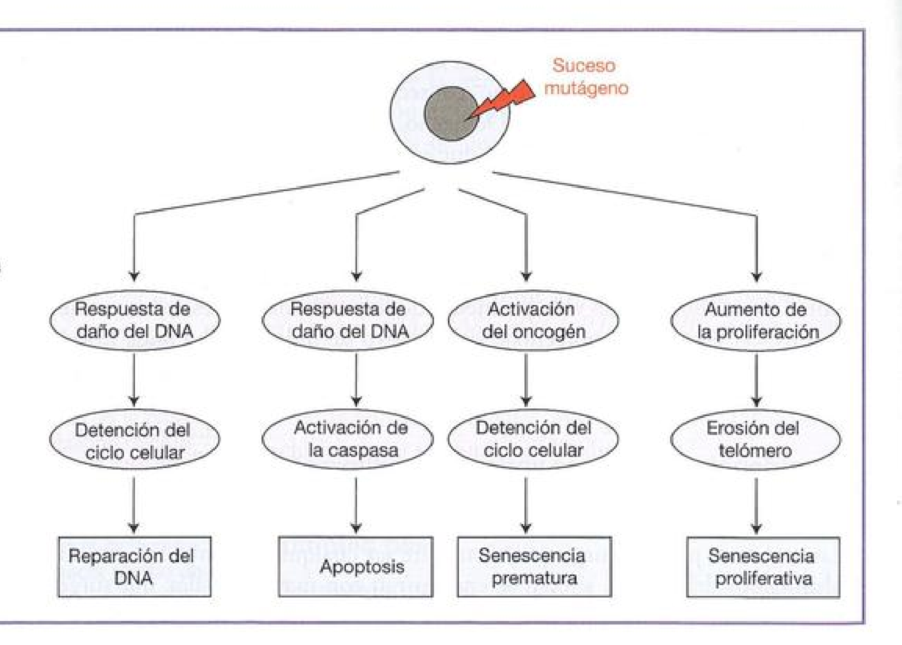


Figura 17.3. Mecanismos celulares intrínsecos de supresión tumoral.

Normalmente, la mutación activa una gama de medidas de seguridad fallidas que dan por resultado la reparación del DNA, la detención del ciclo celular, la apoptosis o la senescencia de la célula afectada. Estas medidas aseguran que la enorme mayoría de las mutaciones no progrese al cáncer.

venientes de otras células (es decir, factores de crecimiento) para permitir que se produzca la división celular. Por lo tanto, para que un tumor se desarrolle las células deben adquirir un aporte continuo de factores de crecimiento o independizarse de la necesidad de señalización de factores de crecimiento. Los tumores suelen conseguir esto a través de mutaciones que amplifican la expresión de receptores para los factores de crecimiento (que puede conducir a la activación constitutiva del receptor), adquirir la capacidad de producir sus propios factores de crecimiento (es decir, la estimulación autocrina) o a través de la mutación de las proteínas claves de la transducción de la señal en cascadas de señalización de factores de crecimiento. Un buen ejemplo de este último es Ras, que se encuentra en una forma mutante en alrededor del 30% de los cánceres humanos. Las mutaciones de Ras que ofrecen una ventaja proliferativa de los tumores son de modo característico aquellas con las que se obtiene un aumento de la función que producen una proteína Ras constitutivamente hiperactiva, que así imitan la acción de la estimulación continua de los receptores para el factor de crecimiento. Muchos otros sucesos oncogénicos actúan de manera similar al desarticular el requisito normal de la estimulación de los receptores para los factores de crecimiento a fin de que se lleve a cabo la división celular. Afortunadamente, cuando aparecen estos sucesos oncogénicos, con frecuencia no resultan en proliferación continua ya que las señales de crecimiento excesivo son con frecuencia percibidas como anormales y conducen a la **senescencia celular prematura**, un estado en el que las células son detenidas de manera permanente y son incapaces de llevar a cabo una división ulterior (Figura 17.3). La senescencia prematura inducida por el oncogén está mediada, en parte, por el aumento de los inhibidores de la cinasa dependiente de ciclina, proteínas que pueden interferir con las enzimas fundamentales implicadas en la coordinación de la división celular.

El acortamiento del telómero actúa como barrera para la transformación celular

Todas las células tienen un número limitado de divisiones celulares que pueden llevar a cabo y esto se ha apodado "límite de Hayflick" en honor al científico que describió por primera vez este fenómeno. Esto se debe a problemas con la replicación de los extremos de los cromosomas (llamados telómeros), que progresivamente se acortan con cada ciclo de división celular. El acortamiento del telómero no es un problema para un buen número de divisiones celulares (alrededor de 45-50 o más) porque los telómeros están compuestos de DNA repetitivo no codificante que pareciera estar ahí para proteger las regiones codificantes de los cromosomas. Sin embargo, llega un punto en el cual los telómeros se vuelven tan erosionados que los extremos cromosómicos comienzan a fusionarse y en este punto cesa la capacidad de las células de dividirse, independientemente de si reciben factores de crecimiento o señales anterógradas suficientes. Se dice que estas células han entrado en **senescencia proliferativa** o han llegado a su límite de Hayflick, y esto actúa como una barrera natural para el desarrollo de tumores (Figura 17.3). Cuando los tumores logran superar el límite de Hayflick, esto parece deberse a la reactivación de la telomerasa, una enzima que es capaz de reparar los extremos de los telómeros, pero normalmente no se expresa en las células diferenciadas.

Las proteínas supresoras tumorales controlan la división celular

Los productos de los **genes supresores tumorales,** como p53 y pRb, actúan como otra barrera para la transformación. Estos productos génicos participan en las redes de señalización que controlan la integridad del genoma, así como en la confirmación de que se han recibido las señales proliferativas correctas antes de permitir el ingreso en el ciclo celular. En el caso de daño del DNA o de señales mitógenas aberrantes, las proteínas p53 y pRb supresoras tumorales pueden detener el ciclo celular, que es seguido por la reparación del DNA y el reingreso en el ciclo celular, la detención permanente del ciclo celular (senescencia) o la muerte celular por apoptosis (Figura 17.3; véase también Videoclip 2).



A pesar de las diversas barreras naturales a la transformación, como se señaló, los cánceres claramente aparecen como resultado de células que logran superar estas medidas de seguridad debido a una serie de mutaciones adquiridas. Sin embargo, sin las contramedidas mencionadas, sin dudas el cáncer sería mucho más común de lo que ya es. Por ejemplo, las personas que nacen con un único alelo mutado *P53* (síndrome de Li-Fraumeni) tienen un riesgo mucho mayor de por vida de desarrollar cáncer, y algunos individuos presentan en forma simultánea varios tipos de cáncer. Del mismo modo, las mutaciones heredadas de *RB* aumentan mucho la probabilidad de desarrollar ciertos tumores, como el retinoblastoma del ojo, un cáncer del cual proviene el nombre de este gen.

El problema del cáncer desde una perspectiva inmunitaria



Muchos tumores parecen escapar de las acciones del sistema inmunitario, un hecho que ha sido una fuente constante de frustración para muchos inmunólogos que alimentan aún la esperanza de que debe haber alguna forma de impulsar al sistema inmunitario para que entre en acción en estos casos. En primer lugar, agradecemos que los avances en la inmunología hayan allanado el camino para una generación de tratamientos nuevos, muy selectivos, con anticuerpos monoclonales humanizados específicos para determinantes específicos expresados en la superficie celular en ciertos tipos de cáncer. Y estas inmunoterapias pasivas son extremadamente eficaces en muchos casos, un tema que es comentado en profundidad al finalizar este capítulo. Sin embargo, hay que decir que el progreso ha sido mucho más modesto en términos de encontrar maneras de aprovechamiento del poder del sistema inmunitario para reconocer y destruir un tumor en la forma en puede reconocer y rechazar a la mayoría de los agentes infecciosos.

En muchos aspectos, esto no resulta sorprendente porque los cánceres no son agentes infecciosos y, por lo tanto, carecen de las marcas moleculares que normalmente permiten

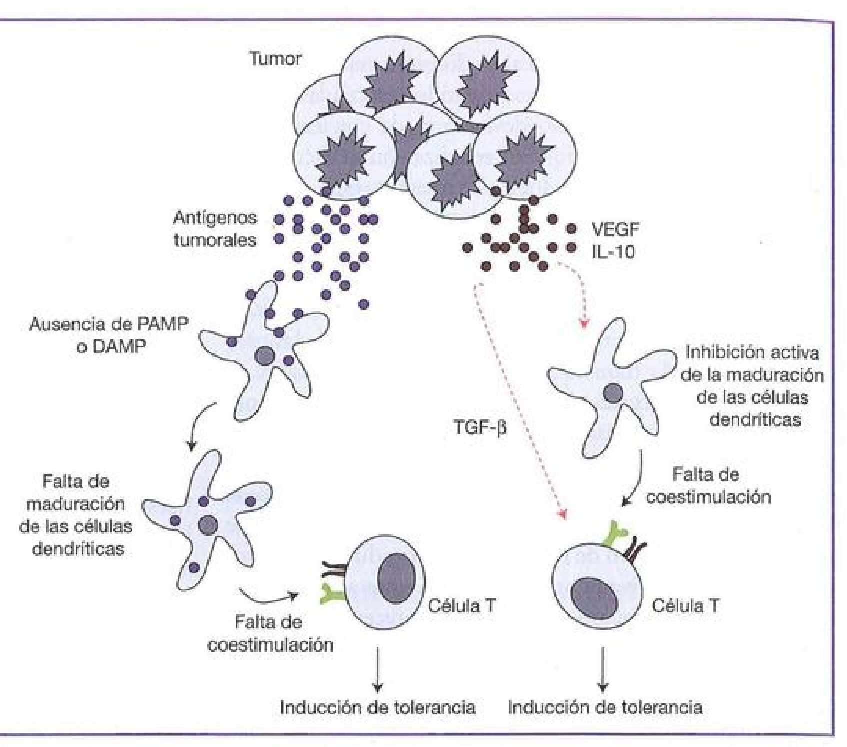


Figura 17.4. La falta de coestimulación de células T da por resultado la tolerancia a los antígenos tumorales.

La tolerancia de la célula T frente a antígenos tumorales puede aparecer en forma pasiva, debido a la falta de los PAMP o los DAMP en el ambiente tumoral para promover la maduración y la coestimulación adecuada de las células dendríticas o en forma activa debido a la secreción de factores (como IL-10, VEGF y TGFβ) por el tumor que, de modo activo, inhibe la maduración de las células dendríticas o la función de las células T.

que el sistema inmunitario reconozca que algo está mal. Esto parece ser el meollo del problema. Los cánceres no atraen la atención del sistema inmunitario o generan un entorno que suele ser tolerógeno frente al tumor. Este estado tolerógeno puede ser pasivo o mantenerse a través de la secreción de varios factores por el tumor que mantienen activamente este estado. Analicemos algunas de las cuestiones.

Los cánceres carecen de PAMP y contienen escasos determinantes no propios

Desde el punto de vista del sistema inmunitario, la naturaleza en gran medida invisible de los cánceres se refiere sobre todo al hecho de que **los cánceres representan lo propio** y, por lo tanto, carecen de los PAMP que normalmente son necesarios para la iniciación de las respuestas inmunitarias eficaces. Como en general los cánceres se inician por factores medioambientales (p. ej., radiación y agentes perjudiciales para el DNA) y no suelen tener un componente infeccioso, normalmente no atraen las atenciones del sistema inmunitario en la forma en que lo hacen los microorganismos que contienen PAMP. Como veremos más adelante en este capítulo, la excepción a esta regla general se aplica a los cánceres que son iniciados por virus, que representan una minoría de los casos.

La falta de coestimulación puede inducir tolerancia hacia los antígenos tumorales

Sumado al problema de la ausencia de determinantes no propios, está el hecho de que las células del sistema inmunitario adaptativo en general no ingresan en los tejidos a menos que sean reclutados allí por las células del sistema inmunitario innato como consecuencia de las respuestas inflamatorias iniciadas por PAMP. Por lo tanto, aunque un tumor exprese una o más moléculas normalmente no expresadas en el cuerpo (p. ej., debido a una mutación que crea una secuencia nueva de aminoácidos), es poco probable que se inicie una respuesta inmunitaria adaptativa a menos que esta molécula sea de alguna manera presentada al sistema inmunitario adaptativo en el contexto de la coestimulación apropiada. Esto nos lleva otra vez a la cuestión de los PAMP. Recuérdese que las células dendríticas residentes en el tejido son inmaduras y no migran a los ganglios linfáticos que presentan el antígeno a menos que sean activadas por un PAMP u otra fuente de estimulación del receptor de reconocimiento de patrón. Por consiguiente, es probable que un neoantígeno generado por un tumor sea ignorado por el sistema inmunitario, a menos que sea presentado por una célula dendrítica madura; de lo contrario, se producirá la inducción de la tolerancia para este antígeno (Figura 17.4). En este último caso, la inducción de la tolerancia sucede por defecto, pero hay pruebas de que los tumores a menudo inducen activamente la tolerancia de las células dendríticas en la vecindad a través de la secreción de IL-10 y VEGF, así como de otros factores, TGFβ por ejemplo, que pueden suprimir la activación, la proliferación y la diferenciación de las células (Figura 17.4). Por lo tanto, gran parte del fracaso del sistema inmunitario adaptativo con los tumores puede explicarse por la tolerancia o la apatía de las células T.

Las respuestas inflamatorias pueden aumentar el crecimiento del tumor

Esto no quiere decir que los tumores sean invisibles al sistema inmunitario. De hecho, los tumores con frecuencia están muy infiltrados por macrófagos y neutrófilos asociados con el tumor pero, paradójicamente, estas células a menudo son activamente reclutadas por el tumor y pueden

promover la progresión y la proliferación tumoral. El efecto paradójico de la inflamación sobre el crecimiento tumoral suele relacionarse con la producción de citocinas inflamatorias y quimiocinas (como IL-1, IL-6 e IL-8) por el propio tumor. Estos mediadores inflamatorios pueden reclutar neutrófilos y macrófagos, que a su vez producen citocinas y otros mediadores inflamatorios que promueven de proliferación del tumor, así como el crecimiento de vasos sanguíneos nuevos (angiogénesis) que son necesarios para la proliferación rápida de las células. Como si esto no fuera ya lo suficientemente malo, hay cada vez más indicios de que células inflamatorias asociadas con el tumor, sobre todo los macrófagos, pueden promover la progresión a la malignidad y las metástasis a través de la producción de especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno que pueden provocar daños del DNA y, en consecuencia, generar mutaciones adicionales. En realidad, la densidad de los macrófagos se correlaciona con un pronóstico desfavorable en alrededor del 80% de los cánceres y ahora hay muchas pruebas de que los tumores con frecuencia "reeducan" a los macrófagos a través de la provisión de citocinas antiinflamatorias (como IL-10 y TGFβ para mantener el tumor en lugar de luchar contra él. Así, los tumores pueden manipular las células del sistema inmunitario para sus propios fines, lo que contribuye más a la dificultad de desarrollar la inmunidad tumoral.

Sin embargo, la situación no es totalmente desesperante, ya que hay casos en los que las respuestas inmunitarias productivas contra los tumores parecen ser capaces de promover la erradicación de tumor. Además, en situaciones en las que los tumores mantienen un ambiente inflamatorio para sus propios fines, es posible atacarlos mediante el empleo de anticuerpos neutralizantes contra citocinas particulares que dirigen el crecimiento de los tumores y mantener un aporte sanguíneo adecuado. Además, los fármacos antiinflamatorios existentes también pueden ser de utilidad en estas situaciones.

Antígenos tumorales y vigilancia inmunitaria

Durante mucho tiempo, los inmunólogos han intentado definir diversas formas para fortalecer el sistema inmunitario de manera que pueda rechazar las células transformadas, de modo similar a la forma en que rechaza con gran eficiencia el tejido trasplantado. La capacidad de rechazar los tejidos trasplantados se puede rastrear a lo largo de la evolución, incluso hasta el nivel de los anélidos. Bastante antes de los estudios dedicados al papel del *c*omplejo *m*ayor de *h*istocompatibilidad (CMH) en las respuestas inmunitarias, Lewis Thomas sugirió que el mecanismo de rechazo del aloinjerto representaba una forma por medio de la cual la **vigilancia inmunitaria** podía controlar a las células del organismo para identificar y eliminar a aquellas alteradas con potencial neoplásico. Para que esta actividad opere, las células cancerígenas deben expresar algún tipo de estructura que permita discriminarlas y puedan ser reconocidas por el sistema inmunitario; estas moléculas suelen denominarse **antígenos tumorales.**

Para que el sistema inmunitario pueda establecer una respuesta inmunitaria eficaz, como mínimo el tumor debe

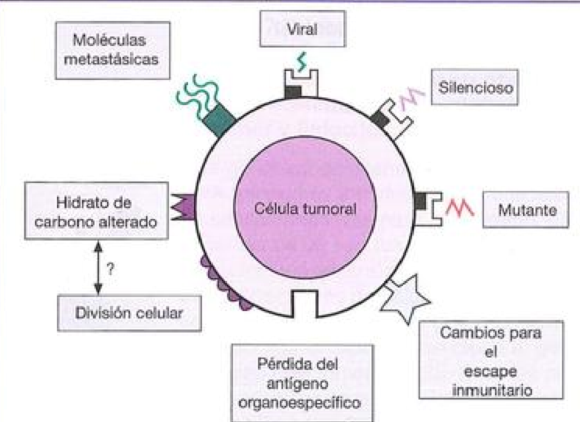


Figura 17.5. Cambios superficiales asociados con el tumor.

hacer notar su presencia a través de la expresión de moléculas que en condiciones normales no se encuentran dentro del organismo o, a la inversa, por la incapacidad de expresar una molécula que suele estar presente en las células sanas (Figura 17.5). Un buen ejemplo de este último mecanismo es la expresión de moléculas de clase I del CMH sobre la superficie de casi todas las células nucleadas; la incapacidad para expresar las moléculas del CMH representa uno de los criterios utilizados por las células NK para seleccionar a las células que deben atacar, y como resultado, las células NK podrían cumplir una función importante en la vigilancia inmunitaria. El antígeno tumoral ideal debería de ser expresado por las células del tumor pero no por las células normales y sería necesario para el crecimiento o el mantenimiento de aquél, lo cual impide que deje de expresarlo a través de un mecanismo de selección dirigido por el sistema inmunitario. También podrían ser aceptables los antígenos diana que son expresados en alto grado por el tumor y por un número restringido de células normales no transformadas, siempre que el daño potencial del tejido normal pueda ser mantenido dentro de un nivel aceptable. Sin embargo, sólo unos pocos antígenos tumorales identificados hasta el momento reúnen los criterios ideales; la mayor parte de las proteínas tumorales corresponde a proteínas no mutadas u otras moléculas que el tumor expresa en forma aberrante. Otros antígenos tumorales representan formas mutantes de proteínas que parecen deberse a la **inestabilidad genómica** que contribuye en el momento inicial a la formación del tumor. Muchos de estos antígenos son específicos para el tumor de un individuo en particular y no son compartidos, lo cual constituye una dificultad para seleccionar los antígenos candidatos que podrían ser útiles en muchos pacientes.

Identificación de antígenos tumorales

Se aplicaron diversas estrategias para identificar los antígenos tumorales. Un enfoque ensayado y comprobado implica la inmunización de ratones con células tumorales para generar paneles de anticuerpos monoclonales que con posterioridad se prueban por su capacidad para discriminar entre las células inalteradas y transformadas del mismo lina-

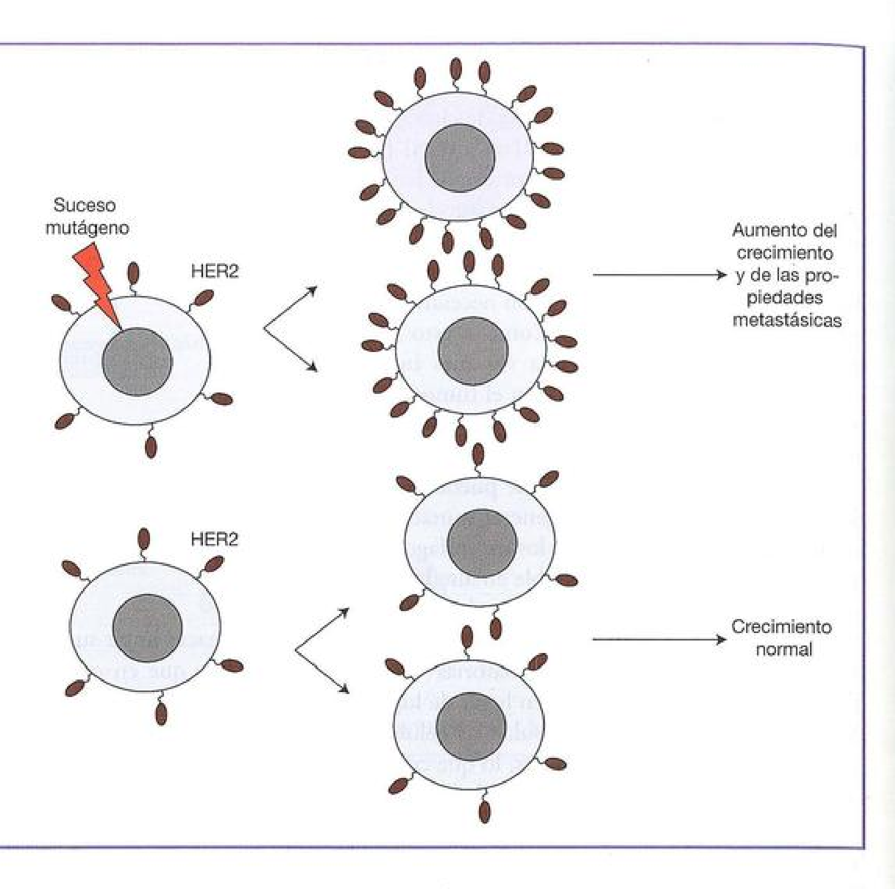


Figura 17.6. La amplificación del oncogén HER2/ Neu puede producir un aumento de la proliferación y progresión a la malignidad.

je celular. Este enfoque ha tenido un éxito limitado para identificar *bona fide* antígenos tumorales, pero con frecuencia condujo a la identificación de moléculas de la superficie celular que están sobreexpresadas o presentan modificaciones postraduccionales sobre tipos determinados de células tumorales.

Un ejemplo clásico es el **receptor para el factor de crecimiento epidérmico humano 2** (**HER2**), que está amplificado en el 15-20% de los cánceres de mama y confiere mayor invasividad en estos tumores (Figura 17.6). HER2 (también denominado Neu) fue originalmente descubierto por Robert Weinberg y cols. al utilizar técnicas de cribado genético para oncogenes transformantes. La transfección del cDNA derivado de una línea celular transformada por métodos químicos dio por resultado la identificación del oncogén HER2/Neu, que está relacionado con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). HER2 fue descubierto con posterioridad al ser amplificado en un subgrupo de cánceres de mama y es importante para el mantenimiento de estos tumores, ya que la ablación de la expresión de HER2 en estos casos llevó a la cesación de la proliferación seguida por la apoptosis. Los anticuerpos dirigidos contra este receptor son eficaces en el tratamiento del subgrupo de cánceres de mama que sobreexpresan HER2, sobre todo si se utiliza en combinación con fármacos quimioterápicos habituales, como doxorrubicina y paclitaxel. La observación de que ciertos tumores expresan cantidades anormales de ciertas moléculas de la superficie celular ha demostrado ser muy útil, dado que varias de estas moléculas han formado la base de tratamientos con anticuerpos monoclonales que demostraron su eficacia contra varios tipos de cáncer (descritos más adelante en este capítulo).

En forma similar a la utilización de anticuerpos como sondas, también se han empleado con cierto éxito genotecas de fagos con Fv de cadena simple para comprobar la presencia de antígenos expresados de modo diferencial en las superficies de las células tumorales, así como antígenos específicos del tumor.

Otro enfoque consiste en aislar células T reactivas del tumor a partir de sangre periférica o del tejido tumoral de pacientes con cáncer y utilizarlas para detectar células diana autólogas transfectadas con genes de una genoteca de cDNA proveniente de tumores (Figura 17.7).

La expansión de células T en respuesta a las células transfectadas con un cDNA específico permite identificar la proteína codificada por este cDNA como un antígeno tumoral candidato. Un enfoque alternativo utiliza péptidos eluidos a partir de moléculas del CMH derivadas del tumor para estimular con pulsos las células presentadoras de antígeno a fin de probar su capacidad para inducir respuestas de los linfocitos reactivos de tumores. Los péptidos que inducen respuestas positivas en estos ensayos se pueden identificar después por secuenciación y purificación; no es un enfoque precisamente sencillo desde el punto de vista técnico, pero es factible de realizar.

Otra estrategia, el **análisis serológico de genotecas de expresión de cDNA recombinante** (SEREX), utiliza un antisuero diluido de pacientes con cáncer para detectar anticuerpos que reaccionan contra proteínas expresadas por el cDNA de las genotecas formadas a partir de tejido cancerígeno (Figura 17.8). Este enfoque se basa en la teoría de que la presencia de anticuerpos antitumorales indica el desarrollo de células T *helper* específicas contra esos antígenos y, hasta el momento, este método permitió aislar más de 1.500 proteínas inmunógenas candidatas a ser antígenos tumora-

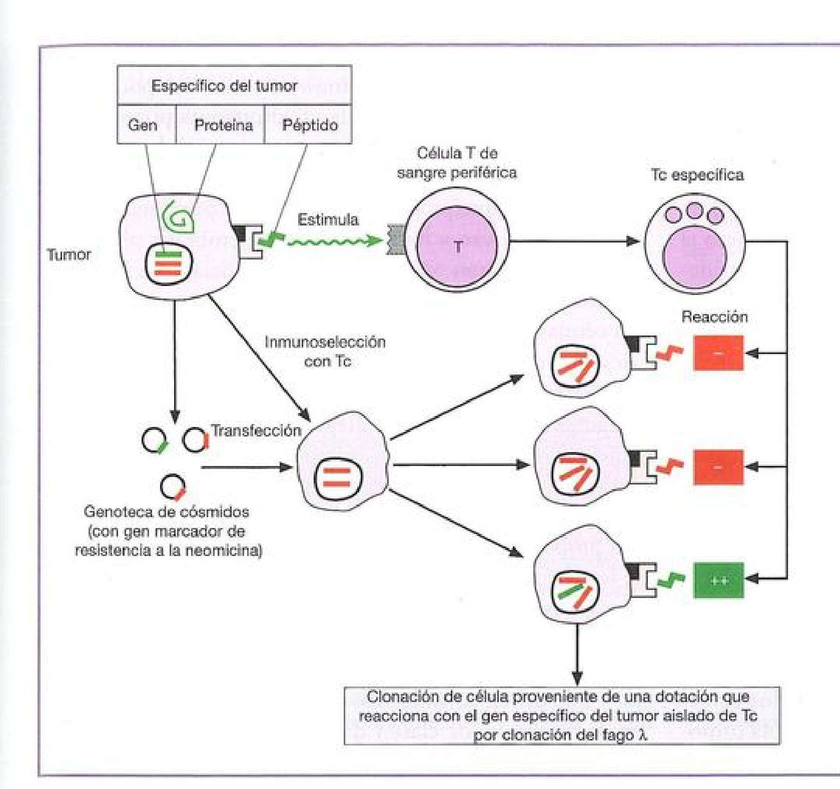


Figura 17.7. Identificación de genes tumorales mediante el empleo de clones de células T citotóxicas (Tc) específicas de tumor procedentes de un cultivo mixto de tumor y linfocitos.

Una genoteca de cósmidos que incorpora el DNA tumoral es transfectada en una línea de células negativas para el antígeno, procedentes de un tipo tumoral natural sometidas a inmunoselección con Tc. Se evalúan pequeños grupos de células transfectadas contra las Tc. Se clona un grupo positivo por limitación de la dilución y se clona el gen específico del tumor (*MAGE-1*) de las hendiduras positivas para el antígeno. (Basada en van der Bruggen P. y col. [1991] *Science* **254**, 1643. Copyright ©1991 por AAAS.). El **MAGE-1** original pertenece a una familia de 12 genes. Se descubrieron otros genes específicos del melanoma, como *MART-1*, *gp100* y *tirosinasa*.

les. En consecuencia, hay muchos candidatos, pero es importante señalar que los ensayos de reconocimiento *in vitro* podrían no seleccionar los antígenos tumorales ideales o válidos; está claro que resulta esencial la validación de los antígenos tumorales, ya que las proteínas que revelan inmunogenicidad *in vitro* muchas veces muestran escasa potencia *in vivo*. Aparte de estos problemas, queda claro que los antígenos tumorales existen; a continuación, se comentarán algunos ejemplos.

Antígenos codificados por virus

Como se mencionó, una proporción minoritaria de tumores (alrededor del 10-15%) se origina a partir de una infección por un **virus oncogénico**, como el virus de Epstein-Barr (EBV) en los linfomas, el virus de la leucemia de células T humana 1 (HTlV-l) en la leucemia, el papilomavirus humano (HPV) en el cáncer de cuello uterino, los virus de las hepatitis B (HBV) y C (HCV) en el carcinoma

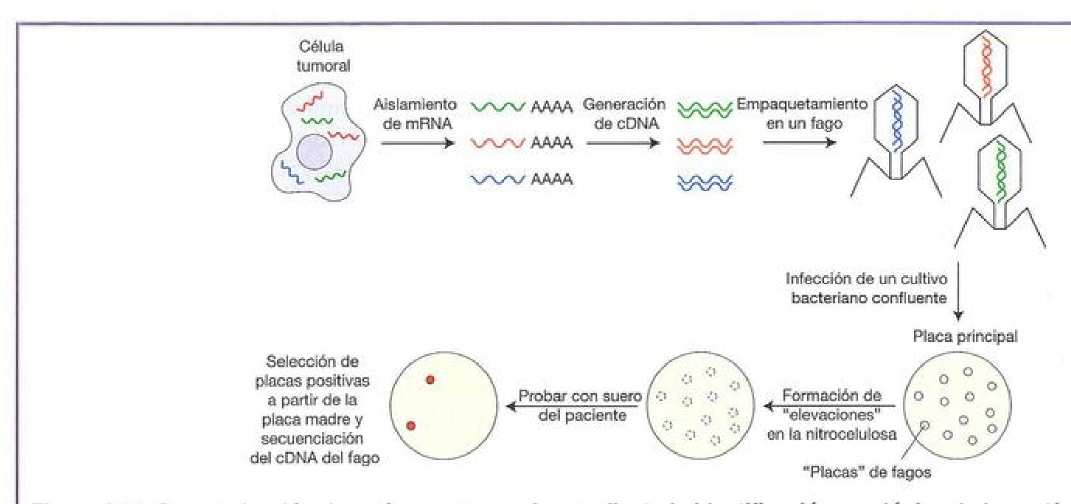


Figura 17.8. Caracterización de antígenos tumorales mediante la identificación serológica de los antígenos expresados por clonación recombinante (SEREX).

En el método SEREX, el mRNA aislado a partir de biopsias de tumores se emplea para construir genotecas de expresión del cDNA que luego se empaquetan en bacteriófagos. A continuación, se infecta el cultivo bacteriano confluente con los fagos en condiciones que permiten expresar las proteínas derivadas del tumor. Se realizan "elevaciones" replicadas del cultivo bacteriano en membranas de nitrocelulosa y se analizan después con antisuero diluido de un paciente con cáncer. Las colonias bacterianas que expresan proteínas derivadas del tumor y se detectan con anticuerpos del suero del paciente se pueden identificar mediante el aislamiento del fago de la colonia relevante y la secuenciación del cDNA dentro de ese fago.

hepatocelular y el virus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV). Algunos de estos virus contienen genes homólogos con **oncogenes celulares** que codifican factores que pueden anular los controles normales que regulan la división celular y la muerte de la célula (apoptosis). En consecuencia, la expresión de estos genes conduce a una transformación maligna. Sin embargo, algunos otros virus, como el virus de la hepatitis B, pueden aumentar de modo considerable el riesgo relativo de desarrollar cáncer, como 100 veces, en una forma que parece no relacionarse con los efectos mutágenos directos del virus sino más bien debido a la inflamación crónica provocada por el virus. Esto plantea una cuestión interesante, que analizaremos en cierta medida en una sección posterior, y es que las respuestas inmunitarias persistentes con frecuencia pueden promover el desarrollo del tumor en lugar de suprimirlo. Ahora hay pruebas para sugerir que las respuestas inflamatorias prolongadas pueden actuar como un conductor de la transformación maligna y, cuando la inflamación se produce una vez establecido el tumor, también puede favorecer su crecimiento a través de la producción de citocinas inflamatorias.

Los péptidos derivados del genoma viral asociados con el CMH que se presentan sobre la superficie de la célula tumoral se comportan como antígenos potentes del trasplante y estimulan el desarrollo de células T citotóxicas (Tc) específicas para el haplotipo. Todos los tumores inducidos por un virus en particular deben expresar el mismo antígeno en la superficie, independientemente de su origen celular, de modo que la inmunización con cualquiera de estos tumores proporciona resistencia a la exposición posterior a los otros tumores, siempre que el virus no experimente mutaciones ingeniosas (Avances y descubrimientos 17.1). Lamentablemente, los virus no son amistosos. Sin embargo, el desarrollo reciente de una vacuna eficaz, que es altamente protectora contra la infección por HPV y el cáncer asociado (sobre todo el cáncer de cuello de útero en las mujeres), así como las verrugas genitales, es un buen ejemplo de que el sistema inmunitario puede hacer frente para eliminar, al menos, algunos tumores malignos. Esto se describirá con mayor detalle más adelante en este capítulo.

Expresión de genes normalmente silenciosos

La división celular descontrolada y desregulada de las células cancerígenas crea un ambiente en el que se pueden expresar los productos de genes que en condiciones normales permanecen silenciosos. A veces, estos genes codifican antígenos de la diferenciación que suelen asociarse con un estadio de desarrollo más temprano. En consecuencia, los tumores derivados del mismo tipo celular suelen expresar **antígenos oncofetales** que también están presentes en las células embrionarias. A modo de ejemplos, se pueden mencionar la α-fetoproteína en el carcinoma de hígado y el antígeno carcinoembrionario (CEA) en el cáncer de intestino. Algunos anticuerpos monoclonales también reaccionan con tumores originados en la cresta neural y en melanocitos fetales. Otro anticuerpo monoclonal define al antígeno SSEA-1 hallado en varios tumores humanos y en embriones incipientes de ratones pero no en las células adultas, excepto en los granulocitos y los monocitos humanos.

Sin embargo, el avance más importante surgió de la observación de que la nucleoproteína viral citosólica podía constituir una diana para las células T citotóxicas por su expresión sobre la superficie celular como un péptido procesado asociado con moléculas de clase I del CMH. Esto permitió establecer el principio general de que las proteínas intracelulares que no van a localizarse en la membrana plasmática superficial podrían aún revelar su presencia a las células T del exterior por el mecanismo del péptido procesado-CMH. Las células T citotóxicas específicas contra las células tumorales obtenidas de cultivos mixtos de células de la sangre periférica con el tumor se puede utilizar para identificar el antígeno que emplea la estrategia descrita en la Figura 17.7. Gracias a una gran proeza, se pudo identificar un gen que codifica un antígeno del melanoma, MAGE-1, que pertenece a una familia de 12 genes, 6 de los cuales se expresan en una proporción significativa de melanomas y en los tumores de la cabeza y el cuello, los cánceres pulmonares no microcíticos y los carcinomas de vejiga. MAGE-1 *no* se expresa en los tejidos normales, salvo en las células de la línea germinal de los testículos, y origina epítopos antigénicos para las células T que deben considerarse específicos de tumor en ausencia de moléculas de clase I del CMH sobre las células testiculares. Esta excitante investigación revela que el antígeno tumoral específico representa la expresión de un gen que en condiciones normales permanece silencioso.

Antígenos mutantes

El trabajo fundamental sobre mutantes tumorales (tum) (Avances y descubrimientos 17.1) confirmó que las mutaciones puntuales en los oncogenes podían ser responsables de la gran diversidad de antígenos hallados en los tumores inducidos por carcinógenos. La inmunidad específica contra los tumores inducidos por sustancias químicas se desarrolla a través de la exposición a la **proteína de choque térmico** 70 (hsp70) y la hsp90 aisladas de las células tumorales, pero su inmunogenicidad se pierde cuando se eliminan los péptidos asociados de bajo peso molecular. Sin embargo, estos péptidos podrían estimular clones de células T CD8 citotóxicas específicas generadas por los tumores y se evidenciaron tres mecanismos posibles que serían determinantes de la estimulación de las respuestas inmunitarias tumorales por las hsp. En primer lugar, estos péptidos pueden actuar como señales "de peligro" a través de la activación de las células presentadoras de antígeno; en segundo lugar, las células tumorales necróticas que expresan las hsp pueden transferir los complejos péptido-hsp a las células presentadoras de antígeno del huésped, donde pueden estimular en forma cruzada a las células T CD8 citotóxicas a través de la vía de presentación endógena de las moléculas de clase I del CMH. Por último, las hsp podrían influir sobre la capacidad de las células tumorales para procesar y presentar los antígenos endógenos mutados y, por supuesto, los "silenciosos", como diana de células T específicas (Figura 17.9).

Hay pruebas suficientes que avalan la producción de péptidos mutados en los tumores humanos. El gen que codifica la proteína fundamental del ciclo celular, p53, es un elemento destacado en las mutaciones asociadas con numerosos cánceres. Las formas mutantes de p53 que suelen detec-

tarse en los tumores perdieron su capacidad de detener la división de las células que experimentaron un daño del DNA; normalmente, este daño desencadenaría el cese del ciclo celular o la apoptosis de la célula afectada. Los genes oncogénicos humanos *ras* difieren de sus equivalentes normales por mutaciones puntuales que, en general, conducen a la sustitución de un único aminoácido en las posiciones 12, 13 o 61. Estas mutaciones originan formas activas constitutivas de Ras que aumentan la tasa de división celular a través de la activación de la vía MAPK y se registraron en el 40% de los cánceres colorrectales humanos y en más del 90% de los carcinomas pancreáticos, al igual que en otras neoplasias malignas. La mutación en el péptido ras puede inducir líneas de células T proliferativas *in vitro*.

Modificaciones en la estructura de los hidratos de carbono

El caótico control interno del metabolismo de las células neoplásicas suele conducir a la presentación de hidratos de

Avances y descubrimientos 17.1—Los tumores pueden inducir respuestas inmunitarias

La primera evidencia convincente de los antígenos asociados con tumores provino del trabajo de Prehn y Main, donde se demostró con bastante claridad que los **cánceres inducidos por sustancias químicas** podían inducir respuestas inmunitarias contra sí mismos, pero no contra otros tumores producidos por el mismo carcinógeno (Figura A17.1.1a). Los tumores inducidos por **virus oncogénicos** difieren en que presentan péptidos virales procesados sobre la superficie de todas las células neoplásicas portadoras del genoma viral, por lo cual las células T citotóxicas generadas por un tumor reaccionan en forma cruzada con todos los demás tumores asociados con el mismo virus (Figura A17.1.1b).

Boon y cols. lograron avances significativos. En primer lugar, demostraron que la mutagénesis aleatoria de tumores trasplantables, o sea, tumores que se pueden transmitir dentro de una cepa pura de ratones sin provocar rechazo, podía dar lugar a una progenie mutante con antígenos fuertes del trasplante. Como resultado, estos antígenos no podrían desarrollarse en animales singénicos con un sistema inmunitario normal y se denominaron variedades **tum**. El equipo de Boon desarrolló una poderosa tecnología (véase la Figura 17.7) que hizo posible utilizar clones de células T citotóxicas específicas para la variedad tum, con el fin de buscar clones cósmidos del gen mutante. Estos dos descubrimientos (el reconocimiento de que las mutaciones en los tumores pueden generar reacciones intensas asociadas con el trasplante y el desarrollo de la técnica para identificar antígenos relevantes con células T citotóxicas) anticiparon adelantos profundos en el campo de la inmunología tumoral y establecieron con firmeza a esta disciplina como elemento clave de la investigación relacionada con el cáncer.

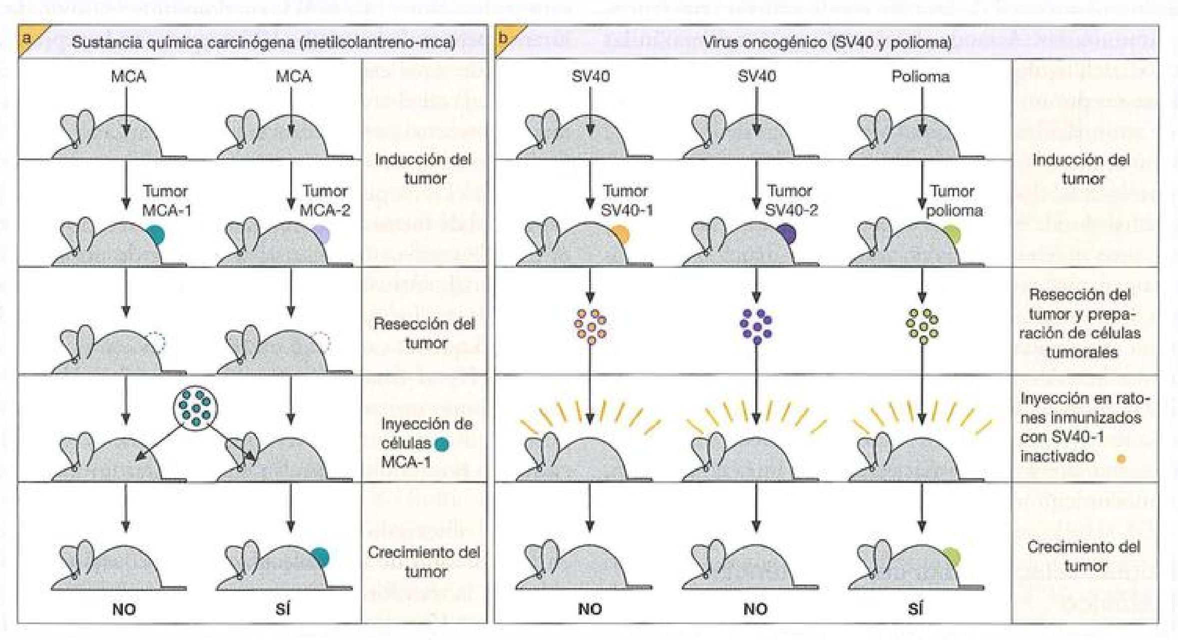


Figura 17.1.1. Especificidad de la inmunidad inducida por tumores. a) Un tumor MCA-1 inducido por compuestos químicos puede generar resistencia a un implante propio, pero no a un tumor generado por el mismo carcinógeno en un ratón singénico. Por lo tanto, cada tumor tiene un antígeno particular, que en la actualidad se sabe que corresponde a una proteína endógena mutante procesada que forma un complejo con una proteína del choque térmico. Hay datos más recientes que sugieren que si se estimulan animales inmunizados con cantidades mucho menores de células tumorales, se podría observar un grado mayor de protección cruzada entre los tumores, que se relaciona con un antígeno oncofetal de 44 kDa, posiblemente una versión inmadura de una proteína receptora de laminina. b) Los tumores producidos por un virus oncogénico determinado generan inmunidad contra los tumores producidos por el mismo virus, pero no por otros en ratones singénicos. En consecuencia, los tumores causados por un virus oncogénico comparten un antígeno.

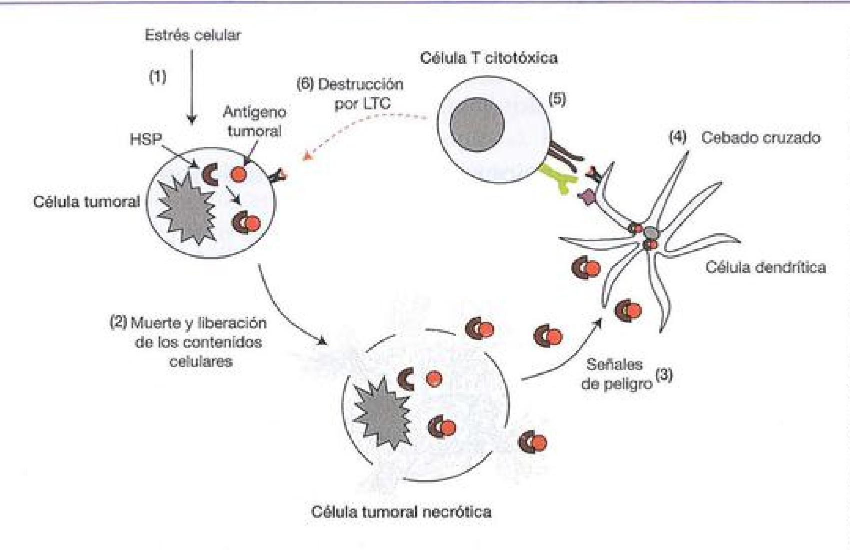


Figura 17.9. Papel de las proteínas de choque térmico (hsp) en la inmunogenicidad tumoral.

(1) Los factores asociados con el estrés estimulan las hsp, que pueden formar complejos con antígenos tumorales procesados e incrementar la presentación de péptidos antigénicos por las moléculas de clase I del CMH en la superficie.(2) Estas proteínas también pueden estimular la necrosis y la liberación de los complejos entre hsp y péptidos, que (3) pueden actuar como señales de peligro estimuladoras de las células dendríticas presentadoras de antígeno y penetrar en el citoplasma, donde (4) pueden ingresar en la vía de procesamiento de las moléculas de clase I del CMH por los denominados cebadores cruzados. (5) Las células T CD8 en reposo se activan y (6) destruyen a las células tumorales. LTC, linfocitos T citotóxicos. (Basado en Wells A.D. y Malkowsky M. [2000] *Immunology Today* **21**, 129.)

carbono con estructuras anormales sobre la superficie celular. Algunas veces se observa un bloqueo de la síntesis, como en la deleción del grupo sanguíneo A. En otros casos se puede producir un aumento de la síntesis de estructuras que están ausentes en las células progenitoras: así, algunos cánceres gastrointestinales expresan el antígeno Lewis Le^a en individuos $Le(a^-,b^-)$ y otros producen cadenas largas que portan Le^a o Le(a,b) diméricos.

La síntesis anormal de mucina puede generar consecuencias inmunitarias. A modo de ejemplo, se considerarán las mucinas del tejido pancreático y el mamario, que están compuestas por un núcleo polipeptídico de 20 series repetidas de aminoácidos con abundantes cadenas de hidratos de carbono unidas al O. Un anticuerpo monoclonal SM-3 dirigido hacia el núcleo polipéptido reacciona poco con el tejido normal donde el epítopo está enmascarado por glucosilación, pero mucho con los carcinomas de mama o páncreas que tengan menos cadenas y más cortas unidas al O. Las células T citotóxicas específicas para las mucinas tumorales no están restringidas por el CMH, y se propuso la hipótesis un tanto herética de que los receptores de las células T (TCR) se unen en forma multivalente a epítopos SM-3 dispuestos muy próximos entre sí sobre las mucinas no procesadas; como alternativa, y más cerca de la línea en cuestión, el reconocimiento depende de las células γδ.

Moléculas relacionadas con el potencial metastásico

Las modificaciones en los hidratos de carbono superficiales pueden ejercer un efecto muy significativo sobre la evolución de la neoplasia maligna. Por ejemplo, los cánceres de colon que expresan sialil Le^x tienen un pronóstico desfavorable y una tendencia más elevada a producir metástasis. En los pacientes con cáncer de pulmón cuyos tumores muestran una deleción del grupo sanguíneo A, el pronóstico es mucho peor que en aquellos con persistencia del grupo A; el hallazgo de que los pacientes que expresan $H/Le^y/Le^b$ también presentan peor pronóstico que quienes carecen de estos antígenos es compatible con esta observación.

La función del **CD44** (HERMES/Pgp-1) en el transporte de las células, sobre la base de su interacción con el endotelio vascular, llevó a vislumbrar su importancia en la facilitación de la diseminación metastásica. CD44 tiene varias isoformas con una cantidad variable de exones entre el extremo transmembrana y el N-terminal. El epitelio normal expresa la isoforma CD44H con dominios de unión de hialurano, pero sin exones v1-v10 interpuestos; la expresión de algunos de estos exones sobre los tumores les proporciona una ventaja en el crecimiento, dado que están presentes con mayor frecuencia en los cánceres más avanzados. La transfección estable de un tumor no metastásico con un clon CD44 de cDNA que contiene los exones v6 y v7 indujo la capacidad de formar tumores metastásicos, efecto que resulta muy llamativo. Además, la inyección de un anticuerpo monoclonal anti-v6 de CD44 impidió el desarrollo de metástasis en los ganglios linfáticos. En la actualidad, se demostró que los exones v6 y v10 se unen con el grupo sanguíneo H y el condroitín 4-sulfato, respectivamente, y la hipótesis más reciente indica que estos hidratos de carbono pueden adherirse al CD44H sobre el endotelio, y desde allí en forma homotípica entre sí, para generar un nido metastásico.

Se han observado con bastante frecuencia modificaciones en la expresión de las moléculas de clase I del CMH. Por ejemplo, la transformación oncogénica de las células infectadas con adenovirus 12 se asocia con una reducción significativa de las moléculas de clase I como consecuencia los niveles muy bajos del mRNA de TAP-1 y TAP-2. A menudo, la mutación desencadena una reducción o un cese de la expresión de las moléculas de clase I, que en la mayoría de los casos se asocia con mayor potencial metastásico y es probable que refleje una menor vulnerabilidad a las células T, pero no a las células NK. Por ejemplo, en el cáncer de mama, alrededor del 60% de los tumores metastásicos carece de moléculas de clase I.

Respuestas inmunitarias espontáneas contra los tumores

Vigilancia inmunitaria contra tumores fuertemente inmunógenos

Varios de los antígenos descritos en la sección anterior pueden provocar respuestas inmunitarias en animales de experimentación, y estas reacciones confieren resistencia contra el crecimiento tumoral, pero su eficacia es muy variable. Los antígenos más potentes asociados con tumores inducidos por virus oncogénicos o luz ultravioleta generan resistencia intensa, mientras que los tumores inducidos por antígenos del trasplante o sustancias químicas (Avances y descubrimientos 17.1) son más débiles y algo variables; el hecho de que los tumores que se desarrollan en los animales espontáneamente generen una respuesta escasa o nula resulta desalentador. La **teoría de la vigilancia inmunitaria** sugiere que se deberían formar más tumores en los pacientes con inhibición de sus sistemas inmunitarios adaptativos. Sin dudas, este parece ser el caso en los **tumores fuertemente inmunógenos**. Se observa un aumento considerable de la incidencia de cáncer de piel en los pacientes inmunodeprimidos expuestos a la radiación solar en regiones al norte de Brisbane y, en general, los pacientes trasplantados sometidos a tratamiento inmunosupresor son más susceptibles a desarrollar cáncer de piel, sobre todo el asociado con papilomavirus, y linfomas positivos para EBV. Los linfomas de Burkitt relacionados con EBV se desarrollan con una frecuencia inusitada en las regiones donde el paludismo es más común, ya que se sabe que esta enfermedad compromete la eficacia del sistema inmunitario. Además, los linfomas que se originan en niños con deficiencia de células T ligada al síndrome de Wiskott-Aldrich o a ataxia-telangiectasia expresan genes *EBV* y revelan una expresión limitada poco usual de las proteínas latentes del EBV, que son los principales epítopos reconocidos por el sistema inmunitario, mientras que no es posible detectar sobre la superficie las moléculas de adhesión celular, como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la molécula asociada con la función linfocítica-3 (LFA-3), que son intermediarios de la formación de conjugados con las células Tc (Figura 17.10). Como la mayoría de los individuos normales tiene células T citotóxicas muy eficientes específicas para EBV, se puede inferir que sólo a través de la inhibición de las moléculas de superficie apropiadas las células del linfoma pueden escapar incluso de la vigilancia limitada desarrollada por las células T que actúan en estos pacientes.

Además de los ejemplos anteriores, se debe tener en cuenta que la incidencia de formación **espontánea** de tumores en ratones carentes de linfocitos T y B no es mucho más elevada que en los individuos con sistemas inmunitarios indemnes; lo mismo se evidencia en los seres humanos inmunodeficientes. Estas observaciones debilitan los argumentos de que las respuestas inmunitarias adaptativas ejercen un papel significativo en la prevención del cáncer. No obstante, si bien las respuestas inmunitarias adaptativas normales podrían no ser suficientes para manejar el establecimiento de muchos tumores, ello no implica necesariamente que no se pueda manipular el sistema inmunitario para generar una respuesta eficaz.

¿Interviene la inmunidad innata?

En la actualidad, hay un inusitado interés por las células ***natural killer*** **(NK)**. En general, se acepta que estas células cumplen una función como mecanismo efector celular temprano contra la diseminación de las metástasis hematógenas. A continuación se presentarán las evidencias que avalan esta teoría. Los pacientes con enfermedad metastásica avanzada suelen tener una alteración de la actividad de las células NK, y los niveles bajos parecen predecir el desarrollo posterior de metástasis. En los animales de experimentación, la eliminación de las células NK de ratones con melanoma B16 resecado en forma quirúrgica produjo el desarrollo descontrolado de enfermedad metastásica y la muerte. La intoxicación aguda por etanol en las ratas aumenta 10 veces la cantidad de metástasis procedentes de un tumor sensible a las células NK, pero no ejerce efecto alguno sobre un cáncer resistente a estas células, lo cual sugiere una probable causa subyacente de la asociación entre el alcoholismo, las enfermedades infecciosas y las neoplasias malignas. (Aquellos que suelen disfrutar de los placeres de Baco no deben deprimirse, sino sentirse recompensados por su efecto beneficioso sobre la cardiopatía, ¡siempre que no se excedan!). La evidencia que relaciona a estas células con la protección contra el cáncer proviene de ratones beige con carencia congénita de células NK. Estos animales mueren con tumores espontáneos que se desarrollan antes que los de sus compañeros de camada +/bg no deficientes, y la incidencia de leucemia inducida por radiación se reduce cuando se inyectan células NK isogénicas clonadas para inhibir a las células preleucémicas. Sin embargo, cabe señalar que los tumores inducidos por sustancias químicas o virus de la leucemia murina se tratan en la forma habitual.

Las células NK en reposo ejercen su acción citolítica espontánea sobre algunos elementos diana tumorales, pero no sobre todos; las células activadas por IL-2 y posiblemente por IL-12 e IL-18 revelan mayor letalidad. Como se describió en el Capítulo 4, el reconocimiento de las estructuras sobre la superficie de la célula diana requiere varios receptores activadores e inhibidores, pero es importante volver a destacar que el reconocimiento de las moléculas de clase I envía una señal **inactivadora negativa** a la célula NK. A la inversa, esto implica que la inhibición de las moléculas de clase I del CMH, que emplean los tumores como estrategia para escapar de las células T citotóxicas (Figura 17.10), las haría **más susceptibles al ataque de las células NK**. Las células tumorales pueden defenderse mediante la expresión de CD99, que inhibe a las células NK CD16, y del inhibidor del crecimiento RCAS1 (receptor para la unión del antígeno del cáncer expresado en las células SiSo), que induce la apoptosis en las células NK y las células T citotóxicas (Figura 17.10). No está claro si la molécula de superficie FasL, que es capaz de repeler el ataque de las células T citolíticas Fas-positivas, también es eficaz contra las células NK, pero la resistencia relativa de las células tumorales contra la apoptosis puede ser una protección innata.

En la categoría de células NK, están surgiendo divisiones. Las células NK, que increíblemente constituyen hasta el

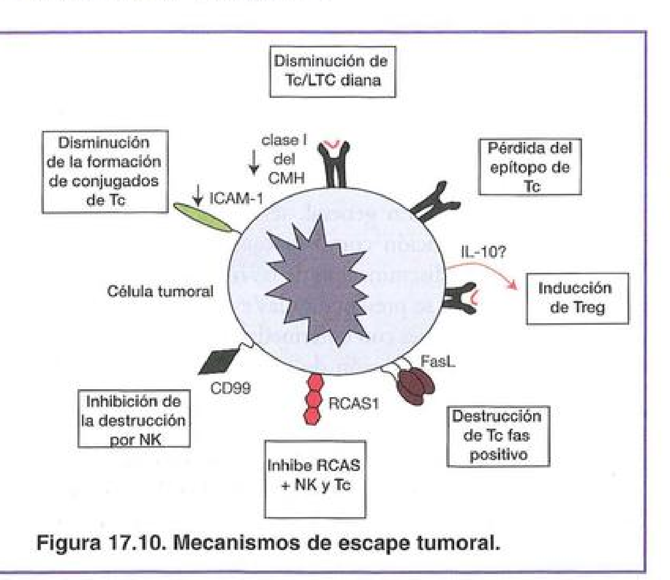


Figura 17.10. Mecanismos de escape tumoral.

50% de los linfocitos asociados con el hígado en los seres humanos, tienen un nivel de expresión más elevado del receptor para IL-2 y moléculas de adhesión, como las integrinas, en comparación con las células NK de la sangre periférica. Estas células son precursoras de un subpoblación de células NK adherentes (A-NK) activadas que se fijan con rapidez a las superficies sólidas bajo la influencia de la IL-2 y se distinguen de las no adherentes por su superioridad para ingresar en los tumores sólidos y prolongar la supervivencia después de la transferencia adoptiva con IL-2 en modelos animales de crecimiento tumoral o desarrollo de metástasis. La variedad de células NK no adherentes destruyen mejor a las células cancerígenas recubiertas por anticuerpos a través de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) y mediada por su receptor FcγRIII CD16.

Sea benévolo con sus células NK. Acostarse tarde por las noches lleva a un acortamiento importante del sueño de ondas lentas que da lugar a una disminución drástica de las células NK y los niveles de IL-2, aparte de enturbiar la mirada.

Mecanismos de escape tumoral

Hay evidencias sólidas acerca de la función del sistema inmunitario en la detección de células, procedentes de observaciones que indican que los tumores emplean una amplia variedad de estrategias para evadir y manipular el sistema inmunitario. En realidad, se podría decir que los tumores están equipados con diversos **mecanismos de escape inmunitario** (Figura 17.10) y, por lo tanto, se asemejan a las infecciones que han tenido éxito. Ya se mencionó que la inhibición de las moléculas de clase I del HLA hace que el tumor sea una diana menos atractiva para las células T citolíticas. Esta es una característica habitual de las metástasis del cáncer de mama y también se observa en el carcinoma de cuello uterino en el que, desde el punto de vista pronóstico, la pérdida del HLA-B44 en las lesiones premalignas es un indicador de la progresión del tumor. En lugar de perder la expresión de todas las moléculas de clase I y correr el riesgo de atraer la atención de las células NK, los tumores podrían perder únicamente la expresión de los alelos de clase I que no son capaces de presentar péptidos antigénicos a las células T.

La inmunoedición elimina las células inmunógenas

Como se mencionó antes en este capítulo, muchos tumores no son demasiado inmunógenos, tal vez porque los tumores muy inmunógenos pueden ser erradicados con facilidad y no logran desarrollarse hasta un punto de que sean clínicamente importantes. De esta manera, el sistema inmunitario podría ejercer una presión selectiva darwiniana de las mutaciones productoras de cáncer que son en gran medida inmunológicamente silenciosas, proceso que se ha denominado **inmunoedición**. Las mutaciones puntuales sutiles en los oncogenes, por ejemplo *RAS*, que ejercen efectos intensos sobre la función de los productos proteicos de estos genes y contribuyen a la transformación, podrían no ser capaces de crear epítopos nuevos que desencadenarían un ataque inmunitario. De manera similar, la pérdida completa de la expresión de genes supresores tumorales importantes, como *P53* o *RB*, a través de mutaciones terminadoras tampoco podría dar lugar a epítopos nuevos.

Inducción de tolerancia contra antígenos tumorales debido a la ausencia de coestimulación

La pérdida de los epítopos de los antígenos tumorales, donde surgen, representa otro mecanismo de escape, y las mutaciones en un virus oncogénico podrían incrementar por sí mismas su potencial oncógeno. Así, la asociación frecuente de una variedad de alto riesgo de papilomavirus humano con los tumores del cuello del útero en individuos HLA-B7 se atribuye a la pérdida de un epítopo de la célula T que, en condiciones normales, genera una respuesta citolítica protectora mediada por B7. Hay una tendencia creciente a considerar que los tumores podrían instituir un microambiente donde se produce la **inducción activa de la tolerancia** de los linfocitos que lo infiltran a través del fracaso de las células dendríticas para expresar las moléculas coestimuladoras apropiadas. Se debe recordar que las células dendríticas que presentan antígenos en ausencia de la coestimulación apropiada en forma de ligandos de CD28 tornan a las células T anérgicas (Figura 17.4). Como describimos antes en este capítulo, pero importante para reiterarlo, una razón por la cual las células dendríticas de las inmediaciones del tumor podrían no ser capaces de activarse sería la ausencia de PAMP o DAMP que pueden estimular a las moléculas coestimuladoras en las células dendríticas que detectan estas señales (Figura 17.4). **Las células dendríticas no se hallan en un estado de activación perpetua** y son incapaces de lograr la coestimulación apropiada a menos que encuentren moléculas adecuadas con propiedades de activación de estas células. En el contexto de una infección, las moléculas activadoras de células dendríticas (ligandos del receptor de tipo Toll) provienen del agente infeccioso y suelen ser estructuras compartidas por muchos patógenos, pero que están ausentes en el huésped. Sin embargo, los tumores



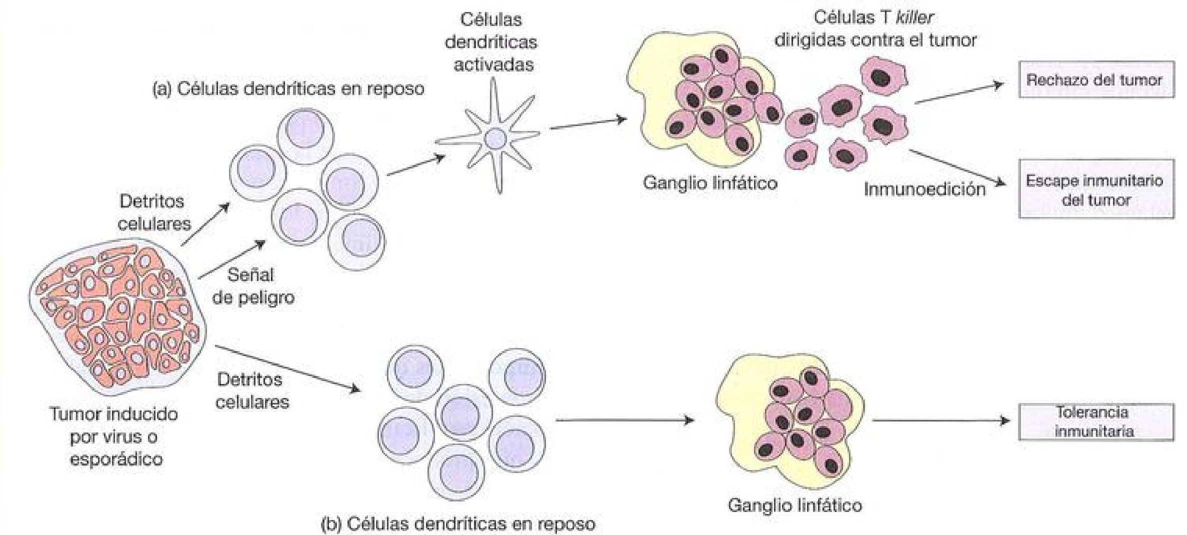


Figura 17.11. Las señales de peligro podrían definir si las células dendríticas estimulan respuestas de células T o inducen tolerancia a los tumores.

Es característico que los tumores en crecimiento liberen material procedente de las células muertas o agonizantes y las células dendríticas locales captan estos detritos y los transportan a los ganglios linfáticos locales para presentarlos a las células T. a) Cuando el tumor libera moléculas ("señales de peligro") capaces de activar a las células dendríticas, se produce la maduración de éstas y están en condiciones de inducir respuestas inmunitarias intensas por las células T apropiadas. Estos tumores podrían experimentar después el ataque inmunitario por las células T activadas con rechazo del tumor o su "inmunoedición" para eliminar sólo las células que presentan el antígeno iniciador de la respuesta. b) En ausencia de señales que activan a las células dendríticas, las células en reposo que detectan material procedente del tumor no se activan y todas las células T que se encuentran posteriormente con ellas adquieren tolerancia a los antígenos derivados del tumor presentados por esas células dendríticas. (Basada en Melief J.M. [2005] *Nature* **437**, 41.)

que liberan señales de peligro endógenas (DAMP) podrían ser incapaces de inducir tolerancia en las células dendríticas y se tornarían susceptibles al ataque inmunitario eficaz, que podría determinar el rechazo del tumor o su persistencia a través de la selección de mutantes para el escape inmunológico (Figura 17.11). En cambio, los tumores que no liberan DAMP podrían ser considerados como propios y no generarían respuestas inmunitarias significativas.

También hay otras razones por las cuales el sistema inmunitario podría adquirir tolerancia a un tumor. Por ejemplo, muchos tumores sólidos secretan grandes cantidades de factores angiógenos como **factor de crecimiento del endotelio vascular** (VEGF) que promueven el desarrollo de vasos sanguíneos nuevos requeridos por el tumor. Asimismo, las evidencias sugieren que el VEGF puede inhibir la maduración de las células dendríticas, y esas células dendríticas inmaduras o parcialmente diferenciadas podrían tolerar a los antígenos que se hallan en las vecindades del tumor.

Mecanismos de contraataque tumoral

Los tumores también pueden reducir su vulnerabilidad al ataque de las células T citotóxicas por medio de la expresión de FasL en la superficies y una molécula inhibidora del crecimiento, RCAS1, que reacciona con las células T portadoras de sus receptores correspondientes y las detiene. Asimismo, se comprobó que los tumores secretan otros factores inmunosupresores, como TGFβ e IL-10 (Figura 17.4). Estos factores podrían contribuir a mantener contenidas las respuestas inmunitarias incipientes mediante la inducción de poblaciones de células T supresoras o reguladoras que inhiben las respuestas contra el tumor. Las células T reguladoras naturales (Treg), que en condiciones normales defienden al organismo de la autoinmunidad, podrían impedir además el desarrollo de respuestas intensas de las células T contra los tumores. Por otra parte, se debe recordar que los defectos internos en la maquinaria de muerte celular, que facilitan el establecimiento inicial del tumor, podrían tornar a estas células resistentes a los mejores esfuerzos de las células T citotóxicas y las células NK para erradicarlas. La mera existencia de mecanismos de tipo "Houdini" respalda la teoría de que el sistema inmunitario adaptativo ejerce una función importante en la inhibición del crecimiento tumoral y ofrece la esperanza de que éste se pueda aplicar en la práctica clínica.

Los cánceres que expresan neoantígenos con **inmunogenicidad baja** no se evidencian en los pacientes que son sometidos a inmunosupresión radical, y aunque a menudo es posible identificar respuestas de células T generadas por los linfocitos que infiltran al tumor o se pueden detectar numerosas células T CD8 específicas para el tumor en la sangre periférica mediante una técnica de tetrámeros de péptidos y HLA, estos cánceres podrían presentar una deficiencia funcional que tal vez sea secundaria a la supresión por IL-10 y TGFβ locales. La mutación de p53 y su sobreexpresión son fenómenos muy comunes en el cáncer humano y suelen asociarse con la producción de anticuerpos; si bien estas características podrían tener alguna utilidad en el

diagnóstico, es poco probable que ofrezcan algún beneficio para el paciente, y el punto de vista actual es que las respuestas *mediadas por células* son esenciales para el ataque contra los antígenos internos expresados por los tumores sólidos. No obstante, si bien con cierta reticencia, se debe aceptar el concepto de que en los tumores con inmunogenicidad débil el organismo experimenta reacciones menores que cumplen un papel poco importante en el bloqueo del proceso neoplásico. Esto no significa que esos antígenos "débiles" no puedan utilizarse con fines terapéuticos, como se comentará en la sección siguiente.

Las respuestas inmunitarias paradójicamente pueden aumentar el crecimiento tumoral

Aunque se tiende a pensar en las respuestas inmunitarias en términos puramente destructivos (tal vez no excesivamente cuando se considera que gran parte de las primeras etapas de una respuesta inmunitaria se ocupa de detectar y eliminar lo que no es propio), una función importante y a menudo pasada por alto del sistema inmunitario es restaurar la integridad del tejido normal después de que una infección se ha resuelto mediante la estimulación de la cicatrización. Con este fin, los macrófagos y otras células de la inmunidad innata segregan factores de crecimiento y otros mediadores que pueden estimular la proliferación del tejido y el endotelio locales con el fin de sustituir las células destruidas durante las etapas agudas de la infección. Ahora hay muchas evidencias de que los tumores, a través del reclutamiento y la "reeducación" de las células inflamatorias hacia un fenotipo con mayor poder cicatrizante, pueden aprovechar las propiedades estimulantes del crecimiento de estas células para subvertir las acciones del sistema inmune innato.

Por ejemplo, la producción de TNFα en el microambiente tumoral puede estimular a las células tumorales con receptores para TNF; esto conduce a la activación del factor de transcripción NFκB, que puede tener dos consecuencias importantes. Por un lado, NFκB puede estimular la expresión de citocinas adicionales, como IL-1 e IL-6, que por acción autocrina puede tener efectos sobre el tumor y estimular su crecimiento. Por otro lado, la activación de NFκB también puede conducir a la expresión de varias moléculas inhibidoras de la apoptosis dentro del tumor que les confiere a estas células mayor resistencia a la destrucción. En ambos casos, el tumor se beneficia por los efectos combinados de la exposición al TNFα. En estas situaciones, el tratamiento con anticuerpos neutralizantes anti-TNF pueden resultar de beneficio terapéutico. Del mismo modo, también se evalúan los inhibidores de NFκB como posibles fármacos quimioterapéuticos.

La infección y la inflamación pueden aumentar la iniciación, la promoción y la progresión del tumor

Aparte de los mecanismos de escape tumoral detallados en la sección anterior, existe considerable evidencia de que la infección y sus consecuencias posteriores (la respuesta inflamatoria) pueden promover el desarrollo de tumores, así como su progresión. Las evidencias iniciales acerca del papel de la infección como un factor que puede influir en el crecimiento del tumor proviene de estudios que indicaron que las infecciones posquirúrgicas en pacientes con cáncer con frecuencia conducen al crecimiento rápido de metástasis (es decir, tumores secundarios) previamente latentes después de la resección quirúrgica de la masa tumoral primaria. Con posterioridad, esto se confirmó por el tratamiento con LPS de ratones con tumores en los que se demostró un efecto significativo en el aumento del crecimiento tumoral, así como en el establecimiento de metástasis.

Ahora es bien aceptado que **la infección y la inflamación crónicas están entre los factores ambientales y epigenéticos más importantes que pueden influir en el establecimiento y la progresión de ciertos tumores.** Por ejemplo, existe una asociación significativa entre el abuso del alcohol a largo plazo, que produce inflamación de los tejidos hepáticos y del páncreas, y los cánceres de estos órganos. Del mismo modo, la enfermedad inflamatoria intestinal se asocia con mayor riesgo de cáncer de colon; la hepatitis viral crónica se asocia con cáncer de hígado; la infección por *Helicobacter pylori* se asocia con cáncer gástrico; la exposición al asbesto y al sílice se asocia con inflamación pulmonar persistente y cáncer de pulmón.

La expresión de TLR sobre los tumores puede aumentar el crecimiento y la supervivencia tumoral

Ya describimos la función de los receptores de tipo Toll y su importante participación sobre todo en las etapas iniciales de la respuesta inmunitaria (véase el Capítulo 1). Los TLR se expresan de modo predominante en las células del sistema inmunitario innato como macrófagos, células dendríticas, mastocitos y células NK, aunque las células B así como las células endoteliales también utilizan estos receptores en varios contextos. La estimulación de los TLR por patrones moleculares derivados del patógeno puede conducir a la secreción de varias citocinas y al reclutamiento de células inflamatorias, como neutrófilos y macrófagos adicionales provenientes de precursores de monocitos. Sin embargo, la evidencia reciente también sugiere que los tumores pueden aprovechar los efectos positivos de la estimulación de TLR para promover la supervivencia y el crecimiento. Se halló que varios tipos de células tumorales expresan TLR y cada vez hay más datos para sugerir que la estimulación de estos receptores en las células tumorales puede promover la proliferación y la supervivencia del tumor mediante señalización autocrina. Esto se debe a que la ocupación del TLR es un estímulo potente de la activación de NFκB (véase la Figura 1.7). Esta última puede ayudar al tumor al menos de dos formas. En primer lugar, al estimular la expresión de productos génicos antiapoptósicos, como los miembros de la familia Bcl-2, que puede hacer que el tumor sea más resistente a la privación de nutrientes y de oxígeno que con frecuencia se produce en el ambiente tumoral. En segundo lugar, mediante la promoción de la producción de citocinas como IL-1 e IL-6, que pueden tener efectos mitógenos sobre ciertos tipos de células, los tumores pueden producir sus propios factores que estimulan el crecimiento. La presencia de factores microbianos, como fuente de ligandos de

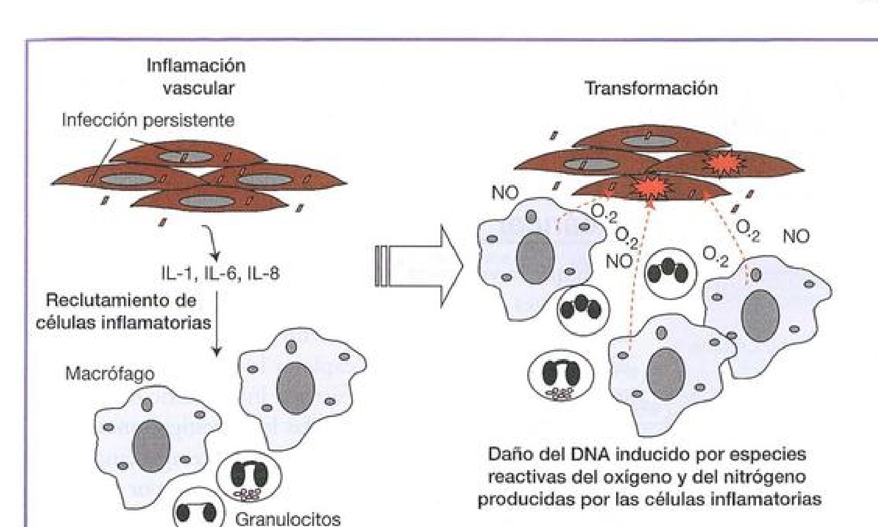


Figura 17.12. La inflamación crónica puede favorecer la transformación maligna.

La inflamación vascular persistente puede conducir a una inestabilidad genética a través del reclutamiento de macrófagos y otras células inmunitarias innatas que son capaces de provocar daños en el DNA a través de la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. El daño persistente del DNA causa la generación de mutaciones que pueden conducir a la transformación celular.

TLR, puede por consiguiente tener beneficios positivos en los tumores que expresan TLR, que es una manera por la cual la infección persistente puede impulsar la progresión tumoral.

El ambiente inflamatorio puede promover la mutación

La infección crónica también puede influir en la oncogenia de otras formas; la producción de citocinas y especies reactivas del oxígeno por las células inflamatorias reclutadas en el sitio de infección también pueden favorecer la iniciación y la progresión tumoral. Las células inflamatorias, sobre todo los macrófagos activados, pueden causar daños del DNA a través de la producción de especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno, y así generar mutaciones que pueden conducir a la transformación celular (Figura 17.12). Si esto sucede de manera ocasional, es tolerable y puede considerarse como una de las desventajas de tener un sistema inmunitario robusto. Además, las células con daños en el DNA pueden ser tratadas a través de la reparación del DNA, la eliminación a través de la apoptosis, o uno de los otros mecanismos celulares intrínsecos de supresión tumoral, como ya comentamos antes en este capítulo (Figura 17.3). Sin embargo, si la respuesta inflamatoria perdura durante meses o años, como sucede por ejemplo en los cuadros crónicos de colitis y hepatitis viral, la respuesta inflamatoria puede aumentar considerablemente el riesgo de transformación maligna a través de la generación de inestabilidad genética en el sitio de inflamación (Figura 17.12).

Ciertas mutaciones oncógenas pueden impulsar la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias

Una proporción sustancial de tumores tiene mutaciones en Ras o en su diana posterior B-Raf que mantienen a estas proteínas constitutivamente activas. La Ras o la B-Raf constitutivamente activas conducen a la activación de las cinasas MEK y ERK posteriores en la cadena, que tienen el efecto de activar una serie de factores de transcripción que pueden promover la división celular. Entre los elementos de acción específicos de estos factores de transcripción están los genes de IL-6 y IL-8 y, en consecuencia, los tumores que portan mutaciones con aumento de la función en Ras y B-Raf con frecuencia expresan estas citocinas. Si esto fuera perjudicial para el tumor, sería de esperar que las variantes clonales surgirían donde estuviera silenciada la expresión de IL-6 e IL-8. Sin embargo, en su lugar parece que la secreción de estas citocinas puede aumentar el crecimiento tumoral de varias formas, como ya señalamos antes. Una posibilidad es que la IL-6 tenga efectos estimuladores sobre el crecimiento autocrino y la supervivencia tumoral, cuya acción produzca aumento de la división celular o expresión de proteínas antiapoptósicas (Figura 17.13). Otra es que IL-6 actúe en forma paracrina en las células estromáticas circundantes para promover la angiogénesis, que lleva a un aumento del aporte de sangre al tumor. De hecho, se encontraron evidencias de que esta última situación sucede en modelos murinos en quienes el crecimiento de los tumores de piel inducidos por sustancias químicas estaba afectado en los ratones con desactivación génica de *IL-6,* y esto se relacionó con los efectos de la IL-6 en células endoteliales cercanas, más que en el tumor propiamente dicho. El uso de ratones con desactivación génica de *IL-6* también proporcionó evidencia clara de que estos animales son resistentes al desarrollo de mieloma maligno, un tumor maligno que afecta el linaje de células B. Además, ciertos polimorfismos del promotor de IL-6, que da por resultado la producción de concentraciones más elevadas de esta citocina, se correlacionan con un cáncer de mama con pronóstico más desfavorable.

Asimismo, se determinó que la IL-8 proveniente del tumor promueve la infiltración de éste por neutrófilos y macrófagos que, como se mencionó antes, puede favorecer el crecimiento del tumor a través de la producción de otras citocinas proinflamatorias, como IL-1 y TNF, así como por la secreción de metaloproteasas de la matriz que pueden remodelar la matriz extracelular y facilitar la propagación del tumor (Figura 17.13). La actividad de las células inflamatorias también condujo a un mayor reclutamiento de células endoteliales y a la promoción de la angiogénesis. El

Cuadro 17.1. Antígenos tumorales potenciales para la inmunoterapia. (Reproducido con autorización de Fong L. y Engleman E.G. [2000] Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annual Review of Immunology* **18**, 245.)

Antígeno	Neoplasia maligna
Tumoral específico	
Región V de la inmunoglobulina	Linfoma no Hodgkin de células B, mieloma múltiple
Región V del TCR	Linfoma no Hodgkin de células T
Mutante p21/ras	Cáncer de páncreas, colon, pulmón
Mutante p53	Cáncer colorrectal, de pulmón, vejiga, cabeza y cuello
Del desarrollo	
Producto de fusión p210/bcr-abl	Leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda
MART-1/Melan A	Melanoma
MAGE-1, MAGE-3	Melanoma, cáncer colorrectal, de pulmón, gástrico
Familia GAGE	Melanoma
Telomerasa	Varios
Viral	
Papilomavirus humano	Cáncer de cuello de útero, cáncer de pene
Virus de Epstein-Barr	Linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo, trastornos linfoproliferativos postrasplante
Tisular específico	
Tirosinasa	Melanoma
gp 100	Melanoma
Fosfatasa ácida prostática	Cáncer de próstata
Antígeno prostático específico	Cáncer de próstata
Antígeno de membrana prostático específico	Cáncer de próstata
Tiroglobulina	Cáncer de tiroides
α-fetoproteína	Cáncer de hígado
Sobreexpresión	
HER-2/neu	Cáncer de mama y pulmón
Antígeno carcinoembrionario	Cáncer colorrectal, de pulmón, de mama
Muc-1	Cáncer colorrectal, de páncreas, ovario, pulmón

uso de anticuerpos neutralizantes anti-IL8 en modelos tumorales inducidos por Ras condujo a una marcada reducción del crecimiento tumoral con gran aumento de la necrosis tumoral aparente.

Aunque es bastante inquietante que los tumores puedan reclutar de modo deliberado células del sistema inmunitario innato mediante la secreción de quimiocinas y citocinas proinflamatorias, esto sugiere que una forma de atacar los tumores puede ser a través de la neutralización de esos factores con anticuerpos monoclonales adecuados, ya que en la actualidad se cuenta con anticuerpos que fueron aprobados para utilizar en otras enfermedades, por ejemplo, la psoriasis.

Enfoques para la inmunoterapia contra el cáncer

Aunque la vigilancia inmunitaria sólo parece actuar contra los tumores muy inmunógenos, la identificación de varios antígenos tumorales representa un avance positivo (Cuadro 17.1) y sentó las bases para explorar la forma en que podrían aprovecharse para reforzar el sistema inmunitario del paciente en la lucha contra el cáncer. Todas las investigaciones coinciden en un punto: si se desea que la inmunoterapia tenga éxito, es esencial que la carga tumoral sea reducida por medio de cirugía, radioterapia o quimioterapia, ya que no sólo parece poco razonable que el sistema inmunitario haga frente a una masa tumoral grande, sino que además la gran cantidad de antígenos liberados tendería en algunos casos a evitar la generación de una respuesta importante debido a la estimulación de células T supresoras y reguladoras.

Así, ¿qué tipo de respuesta inmunitaria se necesita para destruir el tumor? Los estudios realizados durante la última década en modelos murinos y en pacientes con cáncer sugieren que deben cumplirse varios criterios para destruir una cantidad suficiente de células tumorales y ejercer un impacto positivo sobre la evolución de la enfermedad. En primer lugar, deben generarse cantidades suficientes de células T capaces de reconocer con avidez los antígenos tumorales. Estas células deben ser capaces luego de desplazarse hacia el sitio donde asienta el tumor e invadir la estroma (células de sostén) asociada con éste. Por último, esos linfocitos se deben activar en la región tumoral y deben ser capaces de actuar sobre el tumor con gránulos citotóxicos o citocinas como TNF. La experiencia hasta la fecha sugiere que el cumplimiento de todos estos criterios es muy difícil y que la inmunoterapia tiene pocas probabilidades de ofrecer curaciones "mágicas". Es más probable que el próximo paso consista en emplear las manipulaciones inmunológicas junto con la quimioterapia y la radioterapia convencionales.

Tratamiento con citocinas independientes del antígeno

La primera indicación clara de que la manipulación del sistema inmunitario podría ser beneficiosa provino de estudios que emplearon estrategias independientes del antígeno para estimular en forma inespecífica la respuesta inmunitaria contra el tumor. Las citocinas como IL-2, IFN y TNF ejercen efectos pleotrópicos sobre el sistema inmunitario, y algunos de ellos parecen promisorios en modelos de animales y en situaciones clínicas. La toxicidad sistémica limitó la utilidad del TNF, que produce hepatotoxicidad rápida y grave en los modelos de animales y, por consiguiente, se puede aplicar en forma limitada para el tratamiento del cáncer.

Tratamiento con interleucinas

Se administraron dosis elevadas de IL-2 a pacientes con melanoma o cáncer de riñón metastásico, y al menos la regre-

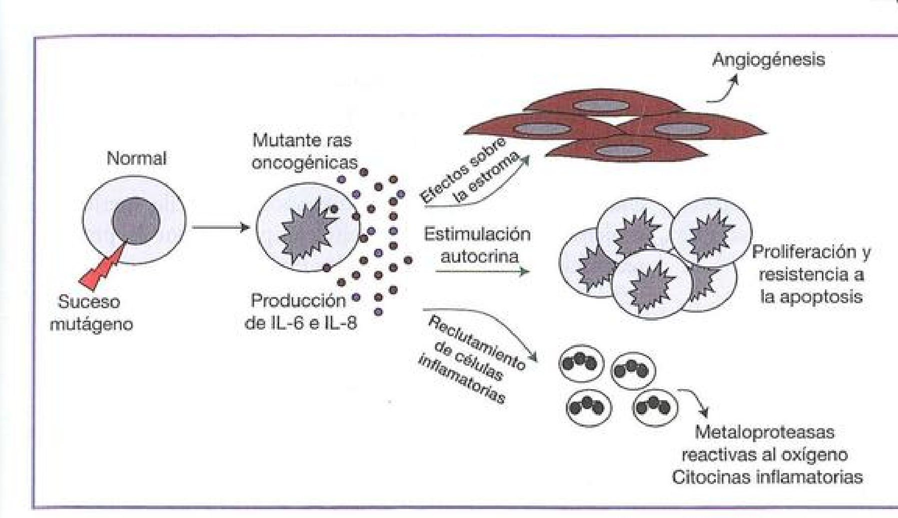


Figura 17.13. Las mutaciones activadoras de Ras pueden conducir a efectos proinflamatorios.

Las mutaciones oncogénicas de Ras y B-Raf pueden conducir a la producción de citocinas proinflamatorias, como IL-6 e IL-8, que pueden tener efectos que favorezcan la supervivencia y el crecimiento de los tumores, como se ilustra.

sión parcial del tumor se observó en el 15 al 20% de los casos, junto con algunas regresiones completas. Los efectos beneficiosos de las dosis elevadas de IL-2 podrían deberse a la estimulación de células T preexistentes que responden contra el tumor o a la activación de células NK. Después de la activación por IL-2 o IL-12, las células NK son capaces de destruir diversas célula tumorales *in vitro* y, de acuerdo con lo indicado por estudios en ratones con glándulas mamarias portadoras del oncogén HER-2/*neu*, parecería razonable realizar una prueba terapéutica con IL-12 en pacientes cancerosos que tienen enfermedad residual mínima en el intento de prevenir las recurrencias e inhibir las metástasis incipientes. Sobre la base de los resultados promisorios observados con la administración de IL-12, se condujeron varios ensayos de vacunas tumorales combinadas con esta citocina.

Tratamiento con interferón

En los ensayos que aplicaron IFNα e IFNβ se confirmó una tasa de respuesta objetiva del 10-15% en pacientes con carcinoma renal, melanoma y mieloma, una tasa de respuesta aproximada del 20% en pacientes con sarcoma de Kaposi, una respuesta de alrededor del 40% en pacientes con diversos tipos de linfomas y una tasa de respuesta notoria en el 80-90% en pacientes con leucemia de células vellosas y micosis fungoide.

Respecto de los mecanismos de los efectos antitumorales, en algunos tumores los interferones podrían actuar sobre todo como agentes antiproliferativos; en otros casos, la activación de las células NK y los macrófagos podría ser importante, aunque la estimulación de la expresión de las moléculas de clase I del CMH podría tornar a estos tumores más susceptibles al control de los mecanismos efectores del sistema inmunitario. En algunas circunstancias, el efecto antiviral podría contribuir a la destrucción del tumor.

En ciertas enfermedades como el cáncer de células renales y la leucemia de células vellosas, los interferones inducen respuestas en una proporción significativamente mayor de pacientes en comparación con los tratamientos convencionales. Sin embargo, en un contexto más amplio, la mayoría de los investigadores considera que su papel está en el tratamiento combinado, por ejemplo, con inmunoterapia activa o con varios agentes quimioterápicos (donde se observó acción sinérgica) en sistemas tumorales murinos. El IFNα y el IFNβ actúan en forma sinérgica con IFNγ y éste lo hace con TNF. El IFNα evidencia un efecto como sensibilizador de la radiación, y su capacidad de incrementar la expresión de receptores de estrógeno en cultivos de células de cáncer de mama sugiere que se podría combinar con antiestrógenos en esta enfermedad.

Factores estimuladores de colonias

El desarrollo celular normal parte de una célula madre inmadura con capacidad ilimitada de autorrenovación y atraviesa estadios de progenitores hasta la fase de células diferenciadas específicas del linaje con potencial de autorrenovación escaso o nulo. El tratamiento tendiente a inducir la diferenciación de las células tumorales se basa en la idea de que la inducción de la maduración celular podría reducir y tal vez anular la capacidad de división del clon maligno. En esta línea se evaluó el GM-CSF, que estimula la diferenciación, reduce la capacidad de autorrenovación y suprime la capacidad de generar leucemia en modelos murinos de leucemia mieloide. En la actualidad, se realizan ensayos con productos recombinantes humanos.

Hace ya más de 100 años, el médico Coley dio su nombre a la mezcla de productos microbianos denominada **toxina de Coley**. Sin duda, esta mezcla estimula al sistema inmunitario innato y produce remisiones en una proporción minoritaria de pacientes. Se sugirió que esos efectos beneficiosos podrían deberse a la liberación de TNF, dado que el endotelio vascular tumoral es muy susceptible a la lesión por esta citocina y es posible inducir fácilmente necrosis hemorrágica. No se sabe si se pueden alcanzar niveles críticos de TNF en los seres humanos porque serían muy tóxicos, aunque un estudio que evaluó la perfusión de un miembro aislado con TNF, IFNγ y melfalán generó lesiones en el endotelio tumoral sin comprometer la vascularización normal. Se cree que el fenómeno de Coley podría estar más relacionado con la estimulación de una inmunidad antitumoral débil preexistente.

Estimulación de las respuestas inmunitarias mediadas por células

El dogma actual sostiene que las células T, y no los anticuerpos, son capaces de atacar los tumores sólidos, en parti-

cular los que expresan antígenos intracelulares procesados sobre su superficie; como la mayor parte de estos antígenos son negativos para las moléculas de clase II del CMH, es probable que se desarrollen respuestas de células T CD8 citotóxicas, aunque las células T CD4 podrían participar en reacciones protectoras contra los vasos sanguíneos asociados del tumor y su presencia es necesaria para la persistencia de las células T CD8.

Vacunación con antígenos virales

Sobre la base de la observación de que algunas formas de cáncer (p. ej., linfoma, carcinoma de cuello uterino, carcinoma hepatocelular) se deben a virus oncogénicos, en la actualidad se intenta preparar vacunas apropiadas contra estos virus. Los virus asociados con cáncer son: virus de Epstein-Barr (EBV), papilomavirus humano (HPV), virus de la hepatitis B (HBV), virus de la hepatitis C (HCV), virus de la leucemia de células T humano-1 (HTLV-1) y virus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV). Desde hace algunos años, se han desarrollado vacunas contra varios de estos virus, pero los progresos se vieron obstaculizados por la inmunogenicidad deficiente de muchos de los candidatos de vacuna probados. Afortunadamente, algunas de estas vacunas se encuentran ahora en la etapa de ensayos clínicos y hemos entrado en la era de vacunación contra varias formas de cáncer.

A nivel mundial, la infección crónica por hepatitis B determina el 80% de todos los cánceres hepáticos, una causa muy importante de mortalidad. Aunque la primera vacuna contra HBV estuvo disponible en 1981, ésta se basaba en una mezcla inactivada de plasma de donantes infectados y su usó se suspendió en 1990 debido al desarrollo de una vacuna más segura y eficaz, basada en un enfoque de subunidad recombinante. La vacuna contra el HBV contiene una forma recombinante de una de las proteínas de la envoltura viral, el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg). La inmunización genera anticuerpos neutralizantes fuertes contra el HbsAg, y la vacunación de recién nacidos condujo a una disminución marcada en las tasas de cáncer de hígado. Los intentos para desarrollar una vacuna contra el virus HCV relacionado resultaron infructuosos hasta ahora, a pesar de los varios ensayos clínicos realizados en estos últimos años. Se encuentran en diferentes etapas de desarrollo las vacunas recombinantes basadas en proteínas, péptidos y proteínas virales que codifican DNA.

Un ejemplo muy reciente de una estrategia de vacunación exitosa contra un cáncer inducido por virus está representado por la aprobación reciente de dos vacunas profilácticas diferentes contra el HPV, la principal causa de carcinoma de cuello uterino en mujeres. El HPV es endémico en la población humana, con cerca del 50% de las mujeres que se convierten en HPV positivas a la edad de 24 años, y es responsable del desarrollo de la mayoría de los carcinomas de cuello uterino en las mujeres, así como verrugas genitales, anales y del pene. En forma global, este tipo de cáncer es la segunda causa más común de cáncer en mujeres y cada año casi el 50% de las mujeres a las que se diagnostica cáncer de cuello uterino fallece por esta causa (alrededor de 500.000 en todo el mundo).

La búsqueda de una vacuna contra el HPV comenzó a fines de la década de 1980 y culminó con la aprobación de la primera vacuna preventiva en 2006. Un año más tarde, también se aprobó otra vacuna preventiva contra el HPV para uso en seres humanos. Estas vacunas han demostrado ser altamente eficaces contra el desarrollo de cáncer de cuello uterino en mujeres. Ambas vacunas están compuestas por la proteína recombinante L1, una de las dos proteínas de la nucleocápside del HPV, derivado de los genotipos más frecuentes del virus: HPV tipos 16 y 18, que son responsables de casi el 70% de los cánceres de cuello uterino. La proteína L1 de la nucleocápside se ensambla en partículas similares a virus, que son idénticas desde el punto de vista morfológico a los viriones del HPV pero que, evidentemente, no son infecciosas y producen una respuesta intensa de anticuerpos neutralizantes que brinda protección contra la infección por HPV a través de la mucosa y las superficies epiteliales.

Lo ideal es que la vacunación contra HPV tenga lugar antes de que haya ocurrido la infección, que en la práctica significa que sea antes de haber iniciado la actividad sexual. Aunque esto no ha sido investigado hasta la fecha, es posible que las vacunas contra HPV puedan tener algún beneficio en los estadios tempranos, precancerosos y displásicos del cáncer de cuello uterino, es decir, después de sucedida la infección.

También hay investigaciones en curso para desarrollar una vacuna contra el virus de Epstein-Barr (EBV), que origina el linfoma de Burkitt, así como el carcinoma nasofaríngeo, uno de los cánceres más comunes en China. El sitio principal de infección por EBV es la cavidad bucofaríngea, y la transmisión se produce por el contacto oral; de ahí el nombre "enfermedad del beso". La glucoproteína de superficie más importante del EBV es la gp350/220, que es el sitio de acción principal de los anticuerpos neutralizantes contra el EBV; se han desarrollado varios candidatos de vacuna basada en gp350/220, pero en general necesitan coadyuvantes fuertes para obtener inmunidad moderada. Están en marcha ensayos clínicos en fase II sobre una de estas posibles vacunas contra el EBV.

Inmunización con células tumorales enteras

Se intentaron varios enfoques mediante el empleo de preparados de células tumorales enteras autólogas y alogénicas en un esfuerzo por desencadenar respuestas antitumorales. Este procedimiento tiene la ventaja de que no es necesario conocer la identidad del antígeno contra el que se debe actuar. La desventaja es que la mayoría de los tumores son poco inmunógenos y no presentan sus antígenos en forma eficaz, por lo cual no es posible superar la **barrera para la activación de las *células T en reposo.*** Debe recordarse que el complejo superficial CMH- péptido no resulta por sí solo suficiente para la activación; se debe llevar a cabo una coestimulación con B7.1 y B7.2 y, tal vez, con algunas citocinas para impulsar a las células T en G0 a iniciar la proliferación y la diferenciación activas. No obstante, al alcanzar este estadio, **la célula T activada ya no necesita la coestimulación accesoria** para reaccionar con su diana específica, dado que revela mayor avidez debido a la sobreexpresión de moléculas de unión accesorias como CD2 y LFA-1 (véase Figura 17.14). Los métodos de inmunización con células enteras han sido en gran medida

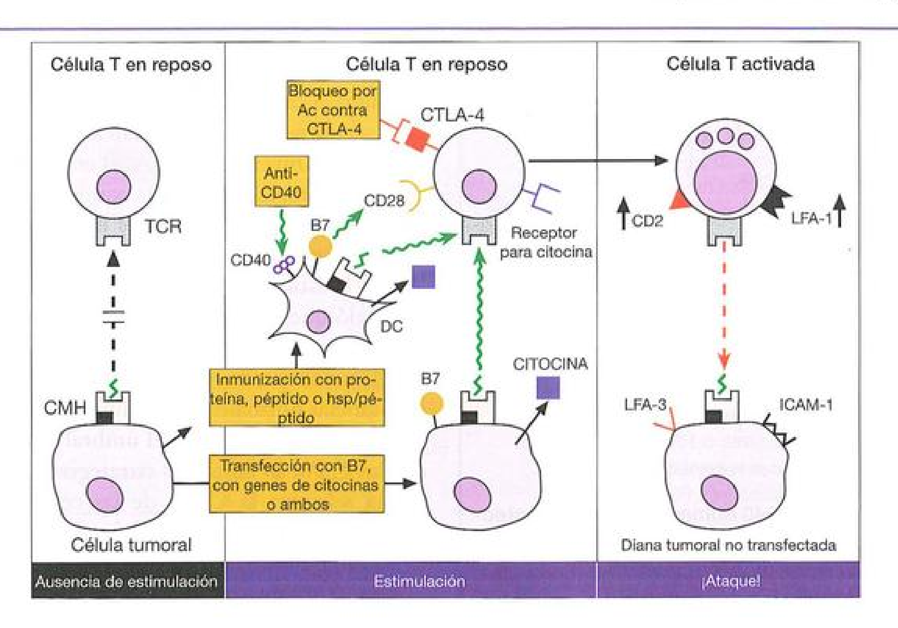


Figura 17.14. Inmunoterapia por transfección con moléculas coestimuladoras.

El tumor sólo puede estimular a las células T en reposo con la contribución coestimuladora de B7-1 y B7-2, citocinas como GM-CSF, γ-interferón y diversas interleucinas, IL-2, IL-4 e IL-7. El bloqueo de CTLA-4 estimula la inmunogenicidad. Como alternativa, los antígenos tumorales presentados por las células dendríticas (DC) también pueden estimular de manera directa a las células T, que pueden activarse a sí mismas mediante la formación de entrecruzamientos entre los CD40 superficiales y los anticuerpos (véase más adelante). Una vez activadas, las células T con las moléculas accesorias sobreexpresadas pueden atacar al tumor original que carece de coestimuladores.

infructuosos en los ensayos clínicos en seres humanos, tal vez por la cantidad muy limitada de moléculas antigénicas presentes en las células enteras, en las que las proteínas en su mayor parte no son inmunógenas.

Cuando se brindó la coestimulación apropiada, se comunicaron resultados alentadores, al menos en los modelos animales. La vacunación con melanoma murino transfectado con B7 generó efectores CD8⁺ citolíticos que protegieron al organismo de la exposición ulterior al tumor; en otras palabras, la transfección permitió que las células del melanoma presentaran sus propios antígenos de manera eficaz, mientras que las células no transfectadas resultaron vulnerables a las células T citotóxicas producidas. También se observó que en una línea de melanoma no inmunógena irradiada sometida a transfección con un vector retroviral portador del gen *GM-CSF* se estimuló una inmunidad antitumoral potente y específica, casi con seguridad por aumentar la diferenciación y la activación de las células presentadoras de antígeno del huésped.

Un método menos sofisticado pero más conveniente, que en definitiva utiliza los mismos mecanismos, consiste en la administración de células del melanoma irradiadas junto con BCG que, mediante la generación de una plétora de citocinas inflamatorias, aumenta la eficiencia de la presentación de los antígenos tumorales procedentes de células necróticas. En un estudio en gran escala con más de 1.500 pacientes, el 26% de los vacunados estaba vivo a los 5 años, en comparación con el 6% de los tratados con la mejor terapéutica convencional disponible. Es interesante suponer que en el futuro se podría exponer un tumor por medios quirúrgicos para luego realizar la transfección *in situ* a través de la descarga de partículas de oro portadoras de las construcciones génicas apropiadas, como B7, IFNγ (para generar la sobreexpresión de las moléculas de clases I y II del CMH), GM-CSF, IL- 2 y otros (Figura 17.14). Hay un riesgo real de inducir respuestas autoinmunitarias contra epítopos crípticos compartidos por otros tejidos normales, pero esto no pasará inadvertido para el investigador prudente.

Tratamiento con vacunas de subunidades

La variedad de antígenos tumorales potenciales identificados hasta ahora (Cuadro 17.1) requirió una inversión considerable en ensayos clínicos terapéuticos que utilizaron péptidos como vacunas. Debido al trabajo original de caracterización de los antígenos específicos del melanoma, este tumor se convirtió en el centro de numerosos estudios que aprovechan al máximo las bases académicas de la inmunología moderna. Después de la vacunación con péptidos en complejos con proteínas de choque térmico o con modificaciones en los residuos de anclaje de clase I para mejorar su unión al CMH, se obtuvieron resultados alentadores en términos del beneficio clínico ligado a la generación de células T citolíticas. Estos péptidos se administran en forma aislada, utilizando virus recombinantes (de viruela aviar, adenovirus y de la vacuna), o como DNA desnudo, junto con un adyuvante. La inclusión de factores accesorios, como IL-2 o GM-CSF, y el **bloqueo de CTLA-4** pueden ser cruciales para el éxito. Las vacunas peptídicas potencialmente inductoras de tolerancia se pueden transformar en cebadores potentes de respuestas de células T citolíticas por la activación de CD40 con un anticuerpo que forma entrecruza-

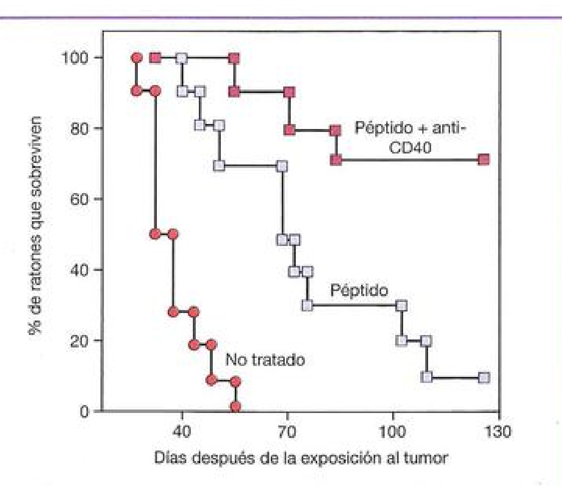


Figura 17.15. La unión con CD40 aumenta el efecto protector de una vacuna peptídica contra un tumor preexistente.

Seis días después de la inyección de células singénicas transformadas por el papilomavirus humano 16 (HPV-16), los ratones fueron inmunizados con el péptido HPV16-17 en adyuvante incompleto de Freund con un anticuerpo monoclonal anti-CD40 o sin éste, o no fueron tratados. (Datos de Diehl L. y cols. [1999] *Nature Medicine* 5,774, reproducida con autorización.)

mientos y es capaz de sustituir a la célula T en la activación directa de las células T citolíticas (Figura17.15). También se demostró que el tratamiento con anti-CD40 solo protege en forma parcial a los ratones con células de linfoma *negativas para CD40*, efecto que se atribuye a la activación de las células dendríticas presentadoras de antígeno endógenas (véase la Figura 17.14). Sin embargo, aunque se registraron algunos resultados promisorios de respuestas inmunitarias contra tumores con estos tratamientos, una evaluación reciente de múltiples ensayos clínicos basados en vacunas que abarcó a 440 pacientes, afectados sobre todo de melanoma, reveló una tasa de respuesta objetiva del 2,6%. Esta estadística más que decepcionante se adecua a la realidad y sugiere que todavía se debe recorrer un largo camino para ser optimista. No obstante, sería prematuro desechar las vacunas en este momento, ya que se debe recordar que todos los ensayos clínicos realizados se llevaron a cabo en pacientes con enfermedad avanzada. Además, todos los tratamientos convencionales revelan más fracasos que éxitos en estos casos. La vacunación con antígenos tumorales podría ser beneficiosa como medida preventiva contra el desarrollo del tumor cuando se lleva a cabo el diagnóstico temprano o cuando se detecta una predisposición genética hacia una forma familiar de cáncer.

Aumento de la inmunorreactividad de los linfocitos existentes que infiltran el tumor

Como se mencionó antes, los tumores exhiben con frecuencia la presencia de infiltrados de linfocitos que parecen anérgicos. Un medio de reactivación de estas células puede ser para neutralizar las señales que sirven para amortiguar la activación de los TCR, siendo un ejemplo paradigmático el CTLA-4. Recuérdese del Capítulo 8 que CTLA-4 puede inhibir la coestimulación del TCR al elevar el umbral para su activación exitosa, como resultado de la competencia por moléculas CD80/CD86 de la célula dendrítica. Así, el bloqueo de la interacción de CTLA-4 con sus ligandos puede impulsar la capacidad de los linfocitos que infiltran el tumor para seguir adelante con la tarea de atacar el tumor; éste es un tema de investigación actual en los pacientes con cáncer.

Una estrategia relacionada comprende la inhibición de los miembros de la familia c-Cbl ligasa de ubicuitina que han sido implicados en la desensibilización del receptor de células T a la estimulación del péptido-CMH. En el Capítulo 8 se señaló que las células T vírgenes deficientes en Cbl-b no requieren de la coestimulación dependiente de CD28 para la activación productiva. Esto parece deberse a que en circunstancias normales Cbl-b suprime ciertas señales iniciadas por el TCR, lo que eleva el umbral para la activación de las células T. Por lo tanto, las estrategias tendientes a inhibir en forma selectiva la Cbl-b de las células T que infiltran el tumor pueden reducir lo suficiente su umbral de activación, de modo que las respuestas inmunitarias productivas sobrevienen ahora sin recurrir a la coestimulación.

Transferencia de células T adoptivas

La transferencia adoptiva de células con gran cantidad de células T expandidas *ex vivo* podría superar algunas de las barreras contra el tratamiento eficaz que se observan con los métodos de vacunación tradicionales (Figura 17.16). Incluso es posible aplicar ingeniería genética para que las células transferidas en forma adoptiva expresen constitutivamente citocinas como IL-2 o GM-CSF para estimular su actividad. La generación de células T citotóxicas efectoras *ex vivo* ofrece la posibilidad de revelar respuestas que no son evidentes en un medio donde podría haber factores inhibidores derivados del tumor o células T reguladoras. El enfoque típico consiste en aislar células T de pacientes y expandir su número *in vitro* en presencia de concentraciones elevadas de IL-2 (Figura 17.16). Para aumentar al máximo la posibilidad de expandir los escasos precursores de células T reactivos contra el tumor, en la actualidad suelen utilizarse células dendríticas maduras que expresan señales coestimuladoras junto con una fuente de antígeno tumoral. Durante un período de 2 a 3 semanas, se puede lograr la expansión de las células T en unas 1.000 veces. Estas células T CD8 expandidas *in vitro* son luego transferidas de nuevo al paciente (¡hasta 10^{11} células por individuo!), pero pueden desaparecer con rapidez si la carga tumoral es elevada. La administración de IL-2 *in vivo* o la cotransferencia de células T CD4 pueden aumentar la supervivencia de las células T CD8; **la presencia de células T CD4 parece ser crucial para la persistencia de las células T CD8** y para el desarrollo de una función efectora citotóxica óptima. El fracaso de los enfoques de vacunación que emplean sobre todo péptidos de clase I podría deberse a la falta de expansión de las células T CD4 y esto se ha de tener en cuenta en los estudios futuros. La transferencia de linfocitos expandidos *in vitro* en huéspedes con depleción linfocítica puede lograr hasta un 75% de células T circulantes con actividad antitumoral, bastante por encima de los niveles obtenidos con las vacunas peptídicas. Aunque el número de pacientes que ha recibido este tratamiento basado en la transferencia adoptiva de células todavía es escaso, se comunicaron tasas de res-

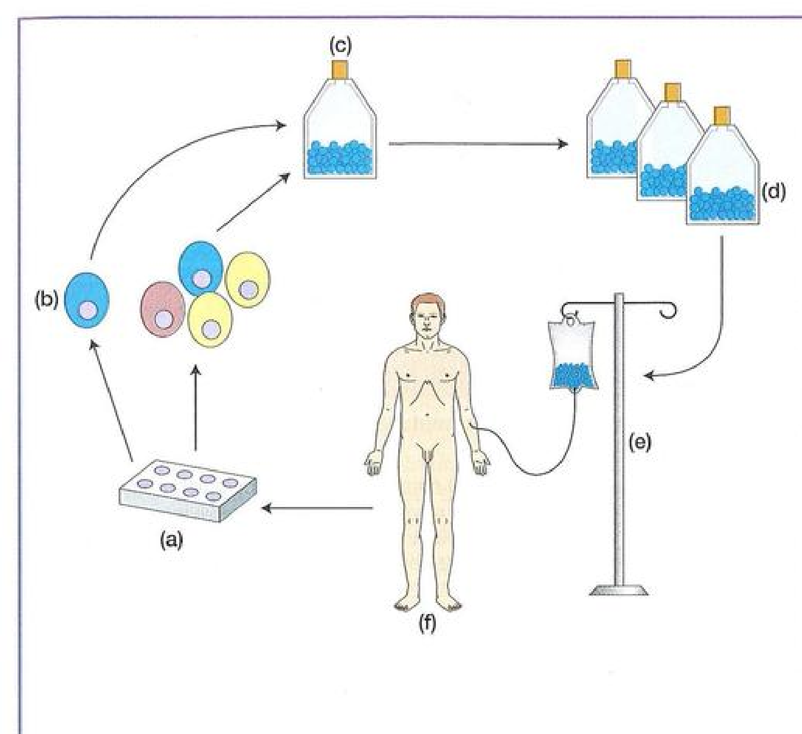


Figura 17.16. Aumento de la eficacia de la inmunoterapia basada en la transferencia adoptiva de células.

Se emplean varias estrategias para aumentar la eficacia de la terapia adoptiva con células T expandidas ex vivo. a) Se estimulan las células T reactivas *(azul oscuro)* contra el tumor con células presentadoras de antígeno in vitro. Para aumentar la estimulación de las células T reactivas contra el tumor, se puede llevar a cabo la transfección de las células presentadoras de antígeno con genes que codifican antígenos tumorales. b) La selección de clones o líneas de células T reactivas contra el tumor puede aumentarse mediante el uso de tetrámeros péptido-CMH o anticuerpos biespecíficos para estimular a los precursores de las células T específicas. c, d) Las células específicas contra el tumor son luego expandidas en IL-2, seguida por e) la infusión intravenosa de células T específicas contra el tumor al paciente. f) La persistencia de las células T transferidas puede ser aumentada mediante la depleción previa de los linfocitos del huésped o la administración de citocinas homeostáticas (IL-2, IL-15, IL-21) después de la infusión. (Basada en Riddell S.R. [2004] *Journal of Experimental Medicine* **200**, 1533.)

puesta objetiva muy notables, del 40 al 50% en los pacientes con melanoma y depleción de linfocitos y las células transferidas persistieron hasta 4 meses. Está claro que cuando se transfiere este gran número de linfocitos activados a un paciente se deben tener en cuenta ciertos riesgos, incluso la posibilidad de generar autoinmunidad contra otros tejidos además del tumor. En estas situaciones, es esencial seleccionar en forma cuidadosa los antígenos tumorales a favor de los que no se expresan o lo hacen en cantidades mínimas en tejidos diferentes del tumor.

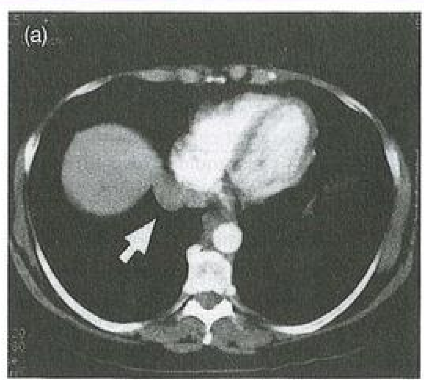
Hay indicios de que la erradicación del tumor mediada por linfocitos sería sólo cuestión de números. Si bien las vacunas peptídicas pueden aumentar entre 5 y 10 veces la cantidad de células circulantes que reaccionan contra el tumor, este número es pequeño en comparación con las observaciones de que hasta el 40% de las células T CD8 circulantes reaccionan contra EBV en los pacientes con mononucleosis infecciosa. Las primeras indicaciones sugieren que la transferencia adoptiva de células es capaz de lograr un número impresionante de células T específicas, en especial cuando se combina con la depleción previa de linfocitos. El ambiente linfopénico podría ser favorable en la medida en que libera espacio en el compartimiento linfoideo para las células T que ingresan y crearía menos competencia para las citocinas homeostáticas como IL-7 e IL- 15. Otra ventaja de este método es que la depleción de los linfocitos del receptor podría eliminar a las células T supresoras/reguladoras que se supone cumplen una función significativo en neutralizar las respuestas antitumorales en el momento inicial.

Tratamiento con células NK

En una sección anterior se comentó la posible importancia de las células NK en la vigilancia tumoral y la destrucción del tumor, por lo cual resulta natural considerar que la expansión *in vivo* o la transferencia adoptiva de grandes cantidades de células NK también podría ser beneficiosa en la clínica. Los tratamientos basados en células NK están un poco menos avanzados que los de las células T, pero no han sido descuidados. En ensayos clínicos en pacientes con cáncer, se evaluaron los efectos de la administración cotidiana de bajas dosis de IL-2 por vía subcutánea tras dosis elevadas de quimioterapia citotóxica para determinar sus efectos sobre el número de células NK y su estado de activación en estos pacientes. Si bien se detectó una expansión de las células NK, no parecieron desarrollar una citotoxicidad máxima, tal vez porque los receptores NK inhibidores hallaron los ligandos apropiados en el tumor. En intentos más recientes, se emplearon células NK de **donantes haploidénticos** relacionados para tratar a pacientes con leucemia mieloblástica aguda y pronóstico desfavorable. La idea era lograr una incompatibilidad parcial entre las células NK del donante y las del receptor con el fin de procurar la activación de las células NK y aumentar la destrucción del tumor. Se observó la expansión y la persistencia de las células NK del donante después de la producción de inmunosupresión en los receptores y se lograron remisiones completas en 5 de 19 pacientes, resultados que son alentadores.

Tratamiento con células dendríticas

El poder reconocido de la **célula dendrítica** para iniciar las respuestas de las células T se convirtió en el centro de atención de una serie cada vez más numerosa de estrategias inmunoterapéuticas que han inducido respuestas inmunitarias protectoras específicas contra el tumor basadas en la inyección de células dendríticas cargadas con productos de la lisis tumoral, antígenos tumorales o tal vez péptidos deri-



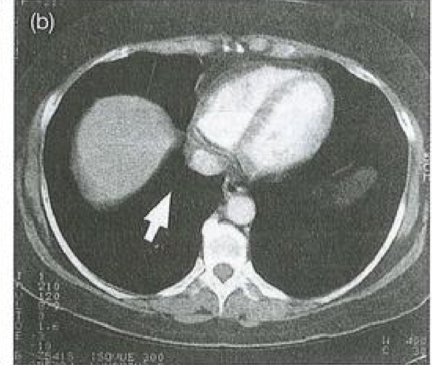


Figura 17.17. Respuesta clínica a la vacuna autóloga con células dendríticas estimuladas por el idiotipo de un linfoma de células B.

Tomografía computarizada del tórax de un paciente: a) antes de la vacunación, y b) 10 meses después de completar el tratamiento con las tres vacunas. La flecha en a) señala una masa paracardíaca. Todos los sitios patológicos se resolvieron y el paciente permanecía en estado de remisión 24 meses después de comenzar el tratamiento. (Fotografía cedida por cortesía del profesor R. Levy del artículo publicado por Hsu F.J. y cols. [1996] *Nature Medicine* **2**, 52, reproducida con autorización de Nature America Inc.)

vados de éstos. Se logró un éxito considerable en modelos animales y se observan progresos en los seres humanos (Figura 17.17). La enorme cantidad de células dendríticas necesarias para llevar a cabo el tratamiento de un solo paciente se obtiene por medio de la expansión de precursores CD34 positivos de la médula ósea en cultivo con GM-CSF, IL-4 y TNF, y a menudo con otros elementos como factor de células madre (SCF) y tirosincinasa 3 del tipo Fms (Flt3) con su ligando. Los monocitos positivos para CD14 presentes en la sangre periférica son más fáciles de recuperar y producen células dendríticas en presencia de GM-CSF e IL-4; no obstante, estas células deben experimentar una maduración adicional con TNFα, lo cual aumenta el costo y la probabilidad de contaminación bacteriana. Otro método consiste en expandir la células dendríticas *in vivo* con la administración de Flt-3 y su ligando. El número de células dendríticas circulantes en la corriente sanguínea aumenta entre 10 y 30 veces y se pueden recuperar mediante leucocitaféresis.

Se pueden destacar algunos aspectos generales. En primer lugar, cuando se emplean péptidos como carga de las células dendríticas, se deben identificar las secuencias que se unen fuertemente a un haplotipo determinado de moléculas de clase I del CMH; las secuencias varían entre los pacientes con diversos haplotipos y podrían no incluir epítopos potenciales de células CD4 *helper*. Las proteínas recombinantes superan la mayor parte de estas dificultades, y una mezcla podría ser mejor porque reclutaría linfocitos T citotóxicos y tendría más probabilidades de "enfrentar" cualquier mutación nueva en los antígenos tumorales. Sin embargo, las proteínas captadas por las células dendríticas son relativamente ineficaces como "cebadores cruzados" de los linfocitos T citotóxicos CD8 a través de la vía de procesamiento de clase I, aunque en la actualidad se exploran diversas tácticas para solucionar este problema, como la conjugación con un péptido "transportador" HIV-tat que aumenta 100 veces la presentación de moléculas de clase I y la transfección con RNA y vectores recombinantes como el virus de la viruela aviar. En segundo lugar, el procedimiento es complicado y costoso pero, si se vuelve más común, puede llegar a ser eficaz y, de todos modos, los costos se deben comparar con los del tratamiento convencional y relacionar con el inconmensurable beneficio para el paciente. En tercer lugar, ¿por qué la administración de pequeñas cantidades de células dendríticas pulsadas con un antígeno induce respuestas de células T específicas y la regresión de los tumores en pacientes que ya tienen abundantes antígenos y células dendríticas? Como se comentó antes en este capítulo, se sugirió que las células dendríticas presentes en los tejidos malignos o en sus proximidades podrían ser defectuosas o inmaduras, tal vez debido a la secreción tumoral de factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) o IL-10, que podría detener la maduración de las células dendríticas para que se conviertan en células inmaduras "tolerantes" al tumor. Estas células dendríticas inmaduras podrían suprimir, en lugar de estimular, las respuestas de las células T reactivas contra el tumor en el momento en que surgen. En este sentido, los datos recientes sugieren que los tumores melanoma que segregan la quimiocina CCL21 reclutan células T reguladoras $CD4^+$ $CD25^+Foxp3^+$, que modifica el ambiente tumoral a uno inductor de tolerancia en contraposición a uno inmunógeno.

Por otra parte, en ausencia de los ligandos apropiados para el receptor Toll (PAMP) o de señales de peligro (DAMP), las células dendríticas inmaduras que capturan antígenos en las cercanías de un tumor podrían no actuar como células presentadoras de antígeno tan eficaces (Figura 17.4). Sin duda, podría ser interesante determinar si el tratamiento directo de los pacientes con Flt-3-ligando más citocinas accesorias o la transfección con MIP-3α (CCL20), que atrae células dendríticas inmaduras, es capaz de desencadenar una respuesta antitumoral a través de la maduración y la activación de las células dendríticas endógenas.

Vacuna contra la neovascularización

Los tumores sólidos están compuestos por células malignas y una variedad de tipos celulares no malignos, como células endoteliales y fibroblastos. Puesto que los tumores

sólidos no pueden crecer hasta alcanzar un tamaño apreciable sin irrigación sanguínea, ellos estimulan la producción de vasos sanguíneos nuevos mediante la secreción de factores angiógenos, como VEGF, que estimulan la proliferación de células endoteliales. Los tumores en vías de crecimiento dependen en gran medida de su irrigación sanguínea, por lo cual el ataque de los vasos tumorales a través de la marcación selectiva de los antígenos expresados sobre ellos podría impedir la llegada de oxígeno y nutrientes al tumor y generar su regresión. El VEGF, uno de los miembros de una familia de factores angiógenos, ejerce sus efectos por la interacción con su receptor afín, VEGF-R2 (también denominado KDR en los seres humanos y Flk-1 en el ratón), que envía señales que estimulan la proliferación, la supervivencia y la movilidad de las células endoteliales. Los anticuerpos dirigidos contra VEGF-R2, o en realidad el propio VEGF, pueden bloquear la angiogénesis en modelos de tumores murinos, pero su extrapolación al ámbito clínico fue dificultada debido a problemas relacionados con el mantenimiento de concentraciones suficientes de estos agentes para inhibir por completo la actividad de VEGF-R2. Otra estrategia consiste en **destruir la tolerancia inmunitaria** a las células endoteliales positivas para VEGF-R2 mediante la estimulación *in vitro* de las células dendríticas con VEGF-R2 soluble seguida de la transferencia de estas células al animal de origen. Una ventaja importante del método es que, a diferencia del tumor en sí, el endotelio tumoral es estable desde el punto de vista genético y representa tejido no transformado, por lo cual es poco probable que se originen células mutantes que no expresen VEGF-R2. Se comunicó que esta estrategia genera anticuerpos neutralizantes específicos contra VEGF-R2 y células T citotóxicas capaces de destruir en forma eficaz las células endoteliales.

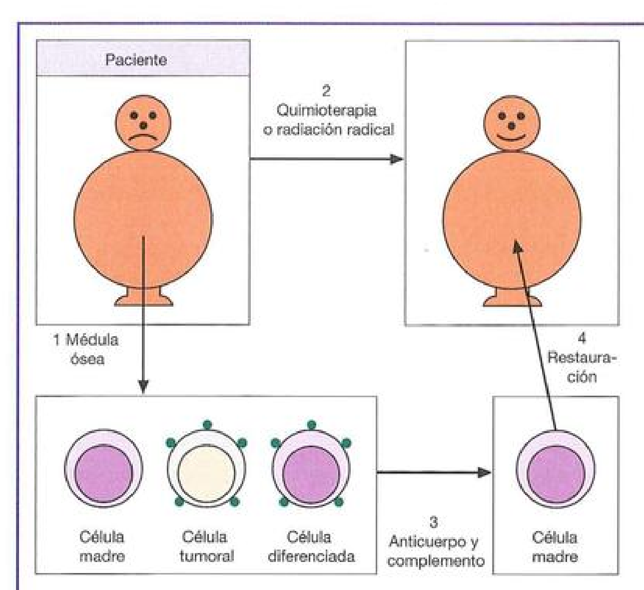


Figura 17.18. Tratamiento de las leucemias con rescate de médula ósea autóloga.

Mediante la aplicación de anticuerpos citotóxicos contra un antígeno de diferenciación (SÍMBOLO) presente en las células leucémicas, e incluso en otras células con diferenciación normal pero ausente en las células madre, se puede obtener de éstas una población exenta de tumor pasible de ser utilizada para restablecer la función hematopoyética en pacientes tratados después con procedimientos radicales para destruir las células leucémicas. Otro enfoque consiste en la selección positiva de las células madre mediante el empleo del marcador CD34.

Tratamiento de la leucemia

El tratamiento de citoablación radical en los pacientes con leucemia mediante el empleo de radioquimioterapia destruye las células madre de la médula ósea. Éstas se pueden extraer antes del tratamiento, se les eliminan todas las células leucémicas con la aplicación de anticuerpos citotóxicos y se las reinfunde luego para "rescatar" al paciente (Figura 17.18). Sin embargo, este tratamiento no permite eliminar todas las células leucémicas, y una estrategia más eficaz consiste en el trasplante de médula ósea *alogénica* de donantes con CMH razonablemente compatibles, lo cual ejerce un efecto importante, a pesar de no comprenderse por completo, de injerto contra la leucemia. La eliminación de las células T de la médula ósea para evitar la enfermedad de injerto contra huésped, que es una complicación grave de estos trasplantes, suprimiría al mismo tiempo la actividad antileucémica deseada; esto representa un dilema. La "terapia de genes suicidas" podría ofrecer una solución, como se ilustra en la Figura 17.19. Las células madre procedentes de la médula ósea alogénica sometida a la eliminación de las células T se deben administrar junto con células T del donante transfectadas con timidina cinasa del virus del herpes simple. Las células T aportan factores que facilitan la aceptación del injerto, la defensa contra la infección viral y la reacción del injerto contra el huésped en un momento en el que el receptor tiene una carga tumoral baja. Con el paso del tiempo y a medida que se desarrolla la enfermedad de injerto contra huésped, las células T agresoras en vías de división del donante se pueden inactivar mediante la administración de ganciclovir a través del mecanismo explicado en el epígrafe de la Figura 17-19.

Una alternativa que evita por completo la enfermedad de injerto contra huésped consiste en inyectar la médula ósea a la que se les eliminaron las células leucémicas junto con un clon de células T citotóxicas alogénicas específicas contra un péptido asociado con la leucemia presentado por el alelo del CMH del futuro receptor. En general, este método funciona porque los residuos sobre las hélices del CMH que se ponen en contacto con el receptor de la célula T permanecen relativamente conservados (a diferencia de los que se encuentran dentro de la hendidura), de manera que las alocélulas T pueden reconocer el complejo CMH-péptido de la leucemia. Los objetivos potenciales son ciclina D1 y mdm-2, que están sobreexpresados en las células tumorales y en particular en las células leucémicas, los factores de transcripción WT-1 y GATA1 y los antígenos de diferenciación mieloperoxidasa y CD68, que son expresados exclusivamente en las células hematopoyéticas y es probable que sean tolerantes en el paciente pero no en el donante de los linfocitos T citotóxicos alogénicos (que se expusieron a diversos péptidos procesados). Un avance magistral sería la transfección del receptor con genes que codifiquen el receptor de la célula T del clon de linfocitos T citotóxicos alogénicos.

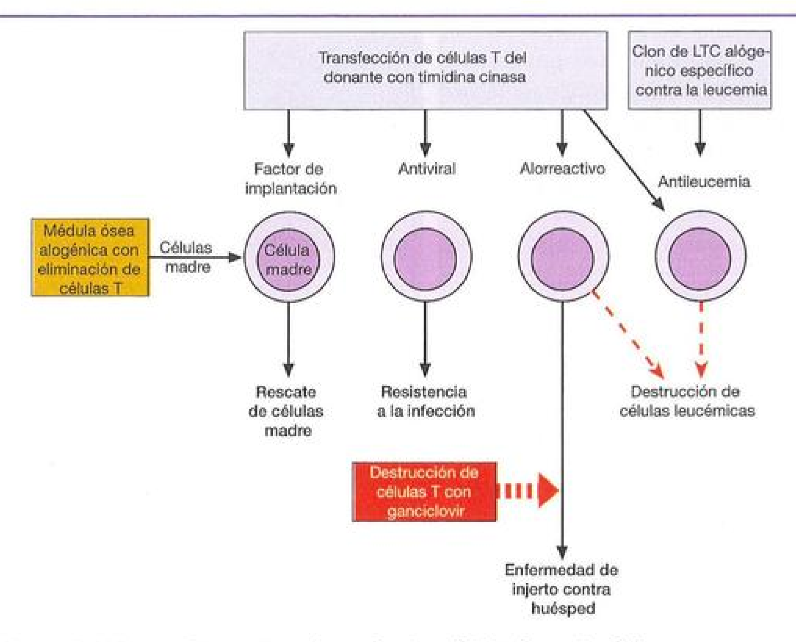


Figura 17.19. Tratamiento de la leucemia con transferencia de médula ósea alogénica.

La médula ósea alogénica a la que se le eliminaron las células T aporta células madre para "rescatar" al paciente tratado con terapia citoablativa. Las células T del donante sometidas a transfección con timidina cinasa contribuyen a la aceptación del injerto, protegen contra la infección y eliminan las células tumorales residuales por un efecto de injerto contra leucemia. Las células alorreactivas producen, por último, una enfermedad de injerto contra huésped y pueden ser eliminadas con la administración de ganciclovir. Éste es convertido por la timidina cinasa en un nucleósido análogo que finalmente se torna tóxico para las células en división. La ilustración alternativa mostrada es para destruir las células leucémicas por la suplementación de la médula ósea alogénica sometida a depleción con un clon de linfocitos T citotóxicos (LTC) específicos contra el péptido de la leucemia producido a partir de células T de un tercero. (Basado en artículos de Cohen J.L., Boyer O. y Klatzmann D. [1999] *Immunology Today* **20**, 172; y Strauss H.J. (1999) *Immunology Today* **20**, 180.)

Inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales

Después de muchos intentos fallidos, los anticuerpos monoclonales por fin cumplen su promesa inicial, y algunos de los resultados más prometedores de los enfoques inmunoterapéuticos para el tratamiento del cáncer se lograron con anticuerpos monoclonales humanizados. Como se señaló con anterioridad (véase el Capítulo 6), los primeros intentos en la utilización de anticuerpos monoclonales de ratón con fines terapéuticos se vieron frustrados por el desarrollo de respuestas inmunitarias intensas contra las secuencias extrañas dentro del anticuerpo murino, es decir, la denominada respuesta de anticuerpos humanos contra ratón (HAMA; h*uman* a*nti-mouse* a*ntibody*). Además, los anticuerpos murinos fracasaron en activar las funciones citotóxicas deseables contra el tumor, como la activación del complemento y la CCDA. Estas primeras dificultades se han solucionado y en la actualidad varios anticuerpos monoclonales "humanizados" ingresaron en ensayos clínicos y se aprobaron 12 de estos anticuerpos dirigidos contra receptores de la superficie celular para su uso terapéutico (Cuadro 17.2). Antes, en este capítulo señalamos el ejemplo del HER2 (receptor para el factor de crecimiento epidérmico humano 2; también conocido como Neu o crb-B2), un miembro de la familia de receptores para el factor de crecimiento epidérmico, y su sobreexpresión en un subconjunto de cánceres de mama (Figura 17.6). Este descubrimiento condujo al desarrollo de anticuerpos monoclonales dirigidos a HER2 (Herceptin), que son eficaces contra tumores que sobreexpresan este antígeno, y que llevó a la aprobación del Herceptin® para el tratamiento del cáncer en 1998. A raíz de este éxito, los anticuerpos dirigidos contra otras moléculas de la superficie celular, como CD20, receptor para EGF y VEGF fueron aprobados para el uso terapéutico y muchos otros se encuentran en la actualidad en la fase de investigación clínica. Además, el sitio web de ensayos clínicos del NIH enumera en la actualidad más de 1.600 ensayos clínicos, ya sea en curso o completados, que comprenden anticuerpos monoclonales dirigidos a varios antígenos de la superficie celular en el cáncer. Por lo tanto, es muy probable que en los próximos años presenciemos la introducción de otros numerosos anticuerpos monoclonales en la práctica clínica ya sea como agentes terapéuticos independientes o como auxiliares de la quimioterapia convencional.

Los anticuerpos dirigidos contra HER2 parecen actuar mediante la alteración de las señales estimuladoras del crecimiento propagada por medio de esta familia del receptor EGF. Aunque HER2 no parece unirse directamente al EGF (aún debe identificarse un ligando para este recepto), puede formar heterodímero con otros miembros de la misma familia de receptor que se une a EGF. Por lo tanto, es probable que los anticuerpos dirigidos al receptor HER2 interfieran con la señalización del factor de crecimiento dependiente del EGF, así como con las señales HER2 que se generan como consecuencia de la elevada expresión de superficie que provocan la

Cuadro 17.2. Anticuerpos monoclonales específicos aprobados o en fases tardías de ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer. (De datos de Adams G.P. y Weiner L.M. [2005] *Nature Biotechnology* **23**, 1147)

Antígeno diana	Formato	Indicación	Estado
HER2/neu	No conjugado	Cáncer de mama	Aprobado para uso terapéutico
CD20	No conjugado	Linfoma	Aprobado para uso terapéutico
CD20	Conjugados con ^{90}Y y ^{131}I	Linfoma	Aprobado para uso terapéutico
Receptor EGF	No conjugado	Cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cáncer de cuello	Aprobado para uso terapéutico
VEGF	No conjugado	Cáncer colorrectal y de pulmón	Aprobado para uso terapéutico
CD52	No conjugado	Leucemia linfocítica crónica	Aprobado para uso terapéutico
CD33	Conjugado con fármaco	Leucemia mieloide aguda	Aprobado para uso terapéutico
Asociado con el DNA	Conjugados con ^{131}I	Cáncer avanzado de pulmón	Aprobado para uso terapéutico
GD2	No conjugado	Neuroblastoma	En fase tardía de ensayos clínicos
CTLA-4	No conjugado	Melanoma	En fase tardía de ensayos clínicos
Moléculas de clase II del CMH	No conjugado	Linfoma no Hodgkin	En fase tardía de ensayos clínicos

detención del crecimiento más que la muerte de los tumores positivos para HER2. Sin embargo, mediante el empleo de ratones que carecen de receptores Fcγ, también se adjudicó una función muy importante a las respuestas de CCDA mediadas por células NK en el modo de acción del Herceptin.

En general, los anticuerpos que reaccionan con los antígenos presentes en la superficie de las células tumorales pueden proteger al huésped como resultado de la opsonización mediada por el complemento del huésped y la lisis (modificada por las proteínas reguladoras del complemento del huésped) y a través de la función de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos por el reclutamiento de los macrófagos y las células NK a través de la ocupación de los receptores FcγRIII, aunque las señales inhibidoras de FcγRII se oponen en parte a la actividad de los macrófagos en este proceso. Esas células portadoras de FcR no sólo actúan como efectores citotóxicos, sino también como superficies multivalentes que forman entrecruzamientos excesivos con las células diana recubiertas con anticuerpos que, en muchos casos, proporcionan una señal de transmembrana que conduce a la apoptosis o el cese prematuro del ciclo celular. Este efecto parece sensibilizar a las células neoplásicas a la irradiación y la quimioterapia que daña el DNA y permite plantear tratamientos sinérgicos promisorios cuya eficacia podría aumentar debido a la mayor inmunogenicidad de las células agonizantes.

Desde hace tiempo, los inmunólogos evalúan la idea de eliminar las células tumorales con anticuerpos específicos ligados a una molécula destructora y desarrollaron numerosas iniciativas realmente ingeniosas. Es axiomático que los fragmentos multiméricos se adhieren con una avidez mucho mayor que los fragmentos monoméricos debido sobre todo a los índices de separación más bajos, y que las construcciones que oscilan entre 60 y 120 kDa sean óptimas para señalar los tumores sólidos, ya que si son demasiado grandes su penetración es difícil y si son demasiado pequeñas su excreción por vía renal es excesivamente rápida. Los fragmentos monovalentes comprenden Fv, scFv seleccionados por antígenos de genotecas de fagos y dominios V_H basados en asas CDR grandes de la cadena pesada de anticuerpos de camellos y llamas. En relación con los polímeros, hay dianticuerpos bivalentes y biespecíficos (analice la diferencia), trianticuerpos trivalentes y triespecíficos, e incluso tetraanticuerpos, y Fabs ligados en forma de dímeros o trímeros.

Inmunoconjugados terapéuticos

Si bien la administración aislada de anticuerpos puede a veces ser eficaz, se lograron adelantos más interesantes en el campo de los inmunoconjugados, en especial en relación con los tumores sólidos. Los inmunoconjugados terapéuticos están constituidos por un anticuerpo dirigido contra el tumor ligado a un componente efector tóxico, que puede ser un radioisótopo, una toxina o una molécula pequeña de fármaco. Los intentos iniciales para tratar los tumores con este tipo de inmunoconjugados fueron decepcionantes, sobre todo porque las cargas citotóxicas útiles conjugadas con los anticuerpos monoclonales eran fármacos quimioterápicos convencionales (como doxorrubicina), que no son lo bastante tóxicos cuando se administran en dosis bajas. Los estudios de dosimetría con **radioinmunoconjugados** indican que cantidades muy pequeñas del anticuerpo administrado por gramo de tumor sólido, entre el 0,01 y el 0,001%, llega realmente al sitio tumoral. Esto implica que el fármaco o la toxina efectora deben actuar en el orden de concentraciones picomolares. La naturaleza del problema se puede comprender cuando se considera que muchos quimioterápicos convencionales son eficaces en concentraciones micromolares o nanomolares.

Esta limitación condujo a investigar muchas más moléculas tóxicas que podrían actuar como conjugados y las toxinas parecieron útiles en un primer momento. Las toxinas proteicas como la exotoxina de *Pseudomonas* y la de la difteria son muy tóxicas *in vitro* y muestran actividad en modelos animales, pero también se comprobó que son muy inmunógenas en los seres humanos e inducen respuestas de anticuerpos neutralizantes que limitan su eficacia y la posibilidad de administrar dosis repetidas, problema conocido como respuesta de anticuerpo humano antitoxina (HATA; h*uman* a*nti-*t*oxin* a*ntibody*). En ciertos casos, casi el 100% de los pacientes desarrolla este tipo de respuesta durante el segundo tratamiento con un inmunoconjugado de toxina. En forma independiente de la reacción del anticuerpo humano contra la toxina, otra desventaja de los **conjugados con inmunotoxinas** es un síndrome que parece secundario a una lesión inespecífica del endotelio inducida por la toxina, denominado **síndrome de filtración vascular**, que también disminuye las dosis máximas toleradas que se pueden utilizar en la práctica clínica. Sin embargo, cuando los pacientes están intensamente inmunosuprimidos, como en las neoplasias malignas hematológicas, los conjugados con inmunotoxinas son beneficiosos; se registraron tasas de remisión completa muy impresionantes, que se aproximaron al 70% en casos de leucemia de células vellosas tratados con conjugados de anti-CD22 y toxina de *Pseudomonas*.

Otro método evaluado durante varios años intenta aprovechar las propiedades citotóxicas de los radionúclidos, como yodo 131 e itrio 90, para irradiar el tumor en forma muy precisa. Se realizaron numerosos ensayos clínicos con estos radioinmunoconjugados, y si bien se lograron algunos resultados muy favorables, por ejemplo con conjugados de anti-CD20 ^{90}Y y ^{131}I para el linfoma no Hodgkin, en general los resultados fueron decepcionantes. Ha resultado difícil alcanzar la eficacia terapéutica con muchos radioinmunoconjugados sin exceder la **dosis máxima tolerada** y con frecuencia se observan efectos colaterales como la mieloablación. Se realizaron intentos para reducir estos efectos tóxicos inespecíficos mediante el empleo de emisores de partículas α, como astatina 211, que tienen una trayectoria mucho más corta que los emisores β y de esta manera permiten reducir el daño colateral de otras células. Estas manipulaciones logran el efecto deseado y la absorción de dosis 1.000 veces más elevadas en los órganos diana con los emisores β que con los emisores α. Sin embargo, el problema asociado con los radioinmunoconjugados con partículas α es que tienen semividas que oscilan desde 60 minutos hasta varias horas, lo cual determina que no se puedan aplicar en la práctica clínica sistemática.

La búsqueda de moléculas tóxicas en concentraciones picomolares permitió descubrir los inhibidores de la polimerización de la tubulina, como la auristatina, y las moléculas que producen rupturas en la cadena doble del DNA, como calicheamicina y esperamicina. Una característica muy destacada de estos agentes es que la conjugación del fármaco con el anticuerpo a menudo lo transforma en un **profármaco** que se debe separar del anticuerpo para volver a ejercer su función. Como la conexión entre el fármaco y el anticuerpo es estable en la sangre, el conjugado casi no genera toxicidad hasta que una célula diana portadora del antígeno lo fija y lo internaliza. Muchos de estos **inmunoconjugados con fármacos** se evalúan en la actualidad en ensayos clínicos o se aprobaron para algunos cánceres, como la leucemia mieloide aguda (anti-CD33-calicheamicina), el cáncer colorrectal y el pancreático (anti-CanAg-DM1), el carcinoma microcítico de pulmón (anti-CD56-DM1) y otras neoplasias malignas graves (anti-Her-2/neu-DM1). Además, se realizan grandes esfuerzos para desarrollar compuestos citotóxicos incluso más potentes para el preparado de los inmunoconjugados con fármacos. Debido a su estabilidad, su potencia y su utilidad clínica, es probable que los inmunoconjugados con fármacos dominen el campo en poco tiempo.

Ataque a la irrigación vascular del tumor

En los tumores sólidos, la investigación se centra en dos objetivos principales: en primer lugar, las **micrometástasis residuales mínimas en la médula ósea** que se desarrollan en un tercio o hasta en la mitad de los pacientes con cáncer epitelial después del tratamiento curativo radical de la lesión primaria; en segundo lugar, el **tejido reactivo estimulado por el proceso maligno**, como los fibroblastos de la estroma que expresan la glucoproteína F19 y vasos sanguíneos recién formados.

Como se señaló antes, en general los tumores no alcanzan más de 1 mm de diámetro sin el soporte de los vasos sanguíneos, cuya formación es estimulada por el tumor mediante la secreción de factores angiógenos como VEGF. Los vasos recién formados son diferentes desde el punto de vista bioquímico y estructural de los vasos sanguíneos normales en reposo y, por esto, representan dianas diferenciales para el tratamiento con anticuerpos monoclonales, incluso a pesar de que las células cancerígenas presentes en los tumores sólidos son menos vulnerables a los anticuerpos dirigidos contra los antígenos específicos sobre su superficie. En consecuencia, los receptores para VEGF y Eph, la fibronectina oncofetal, las metaloproteasas de la matriz MMP-2 y MMP-9 y los marcadores pericíticos aminopeptidasa A y proteoglucano NG2 se expresan en concentraciones elevadas y en forma muy selectiva en los vasos que experimentan angiogénesis. Por consiguiente, la investigación se ha dirigido a los inhibidores de la angiogénesis, como los anticuerpos monoclonales humanizados contra VEGF y su principal receptor VEGF-R2.

Una maniobra digna de ser mencionada, e inesperadamente eficaz, consiste en identificar péptidos que se localizan de manera específica en las células endoteliales de algunos tumores mediante la inyección de genotecas peptídicas *in vivo*. Uno de los paneles de estructuras peptídicas que surgió de esta estrategia comprende RGD en el péptido cíclico CDCRGDCFC, que se une de modo selectivo con las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ que se sabe están sobreexpresadas en las células endoteliales del tumor. Para su empleo terapéutico, estos péptidos deben ser unidos a fármacos apropiados, como doxorrubicina, o a un péptido proapoptósico. En forma global y sin lugar a dudas, se cuenta con una cantidad significativa de dianas para estas "balas mágicas".

Inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias en el ambiente tumoral

Sobre la base de la observación de que la producción de citocinas proinflamatorias por los macrófagos y los fibro-

blastos asociados con el tumor con frecuencia resulta beneficiosa para el tumor, puede haber casos en los que los anticuerpos neutralizantes hacia IL-6 y TNF, así como otras citocinas proinflamatorias, puede tener efectos beneficiosos en términos de reducir la irrigación y la red de sostén de la estroma en la vecindad del tumor. Los estudios en ratones revelaron que los anticuerpos neutralizantes contra el TNF, como también los inhibidores de NFκB pueden tener efectos protectores en los modelos de cánceres de colon y de mama.

RESUMEN

Transformación celular

- El cáncer es causado típicamente por lesiones genéticas que afectan a genes que estimulan la proliferación junto con otras lesiones que interfieren la eliminación de las células a través de la apoptosis.
- El cáncer no es una enfermedad única y representa un amplio espectro de entidades causadas por el fracaso de los controles que en condiciones normales rigen la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de las células.
- La transformación celular es un proceso de múltiples pasos y comprende la adquisición de una serie de mutaciones en oncogenes y genes supresores tumorales que cooperan para alcanzar el estado completamente transformado.
- La incidencia del cáncer varía entre los tejidos.
- Los agentes mutágenos, que incluyen los virus, estimulan la transformación celular.

Existen varios mecanismos celulares intrínsecos de supresión tumoral

- El requerimiento de factores de crecimiento normalmente impide el crecimiento descontrolado.
- El acortamiento del telómero actúa como barrera para la transformación celular.
- Las proteínas supresoras tumorales controlan la división celular y pueden utilizar varias contramedidas tras la detección del daño del DNA o la señalización mitógena aberrante, que incluyen: reparación del DNA, senescencia celular prematura o apoptosis.

El problema del cáncer desde una perspectiva inmunitaria

- Las células transformadas no suelen ser demasiado inmunógenas y, por consiguiente, no son reconocidas por las células del sistema inmunitario.
- Los cánceres carecen de PAMP y contienen escasos determinantes no propios.
- La falta de coestimulación de las células T puede inducir la tolerancia a los antígenos tumorales.
- Las citocinas inflamatorias pueden aumentar el crecimiento tumoral.

Antígenos tumorales

- Hasta el momento, se identificaron numerosos antígenos tumorales como candidatos, pero la mayoría es específica para un tumor en particular y no son compartidos entre los individuos.
- Los péptidos procesados que provienen de virus oncogénicos son antígenos del trasplante potentes asociados con el CMH.
- Algunos tumores expresan genes que permanecen silenciosos en los tejidos normales: a veces, se han expresado previamente en la vida embrionaria (antígenos oncofetales).
- Muchos tumores expresan antígenos débiles asociados con mutaciones puntuales en oncogenes como ras y p53. Los péptidos presentados por las proteínas de choque térmico 70 y 90 constituyen los únicos antígenos tumorales inducidos por sustancias químicas. La Ig de superficie en las células de la leucemia linfocítica crónica es un antígeno tumoral específico único.
- La desregulación de las células tumorales suele ocasionar anomalías estructurales en los hidratos de carbono superficiales.
- Los exones v6 y v10 de CD44 están vinculados íntimamente con el potencial metastásico. La pérdida de los determinantes del grupo sanguíneo A se asocia con un pronóstico desfavorable.

Respuesta inmunitaria contra los tumores

- En general, las células T establecen una vigilancia efectiva contra los tumores asociados con virus oncogénicos o inducidos por UV, que son muy inmunógenos.
- Los tumores menos inmunógenos no están sujetos al control de las células T, pero a veces evocan respuestas de grado bajo.
- Es probable que las células NK cumplan una función en la limitación del crecimiento tumoral y las metástasis. Son capaces de atacar a las células tumorales negativas para las moléculas de clase I del el CMH porque éstas envían una señal negativa de inactivación contra las células NK. La subpoblación A de células NK, que expresa concentraciones elevadas de moléculas de adhesión, es más citolítica para las células tumorales nuevas.
- Los tumores utilizan varios mecanismos para escapar a las respuestas inmunitarias del huésped, lo cual sugiere que el sistema inmunitario ejerce una presión selectiva sobre aquéllos.

La infección y la inflamación pueden aumentar la iniciación, la promoción y la progresión del tumor

- La expresión de TLR en los tumores puede aumentar el crecimiento tumoral y la supervivencia a través de aprovechar la sobreexpresión dependiente de NFκB de las proteínas antiapoptósicas, que pueden formar tumores resistentes al estrés. La activación de NFκB dirigido por TLR también puede conducir a la producción de citocinas, como IL-1 e IL-6, que pueden tener efectos autocrinos estimuladores del crecimiento.
- El ambiente inflamatorio puede fomentar la mutación a través de la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que pueden provocar daño del DNA y generar mutaciones que impulsan la transformación celular.
- Ciertas mutaciones oncogénicas pueden promover la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias; en consecuencia, se reclutan células del sistema inmunitario innato que pueden aumentar la proliferación tumoral, el crecimiento de vasos sanguíneos nuevos (angiogénesis) y la diseminación tumoral.

Enfoques para la inmunoterapia contra el cáncer

- La inmunoterapia sólo es eficaz después de la reducción de la masa tumoral.
- Es posible aprovechar los mecanismos inmunitarios innatos. Las concentraciones elevadas de IL-2 pueden estimular respuestas contra el melanoma maligno y otros tumores, y la IL-12 sistémica puede ser eficaz contra la enfermedad residual mínima. El IFNγ y el IFNβ son muy eficaces en los trastornos de las células T, la leucemia de células vellosas y la micosis fungoide, y menos importantes, pero aún significativos, en el sarcoma de Kaposi y varios linfomas. El GM-CSF estimula la proliferación y reduce la capacidad de generar tumores en las leucemias mieloides murinas.
- Las vacunas contra el cáncer basadas en proteínas virales oncogénicas tienen grandes probabilidades de ser eficaces y podrían constituirse en medidas profilácticas contra los cánceres inducidos por virus, como el cáncer de cuello uterino.
- Los tumores débilmente inmunógenos provocan respuestas anticancerígenas si reciben un adyuvante, como BCG, o son sometidos a la transfección de moléculas coestimuladoras como B7 y las citocinas IFNγ, IL-2, IL-4 e IL-7.
- Los linfocitos T citotóxicos CD8 pueden atacar tumores sólidos, y la presencia de células T CD4 *helper* puede ser necesaria para la persistencia y la función efectora óptima de las células T CD8.
- Se identificaron varios antígenos tumorales potenciales y se realizan grandes esfuerzos para investigar la aplicación de los péptidos como vacunas de subunidades. Su inmunogenicidad puede aumentar mediante la formación de complejos con proteínas de choque térmico y factores accesorios como GM-CSF, el bloqueo de CTLA-4 y la estimulación de anti-CD40.
- Los ensayos clínicos con vacunas peptídicas fueron desalentadores, pero la inmunoterapia basada en la transferencia adoptiva de células con células T CD8 expandidas *in vitro* es más promisoria.
- Se crearon inmunógenos poderosos por la estimulación de células presentadoras de antígeno con péptidos procedentes de antígenos del melanoma y regiones que enmarcan al CLL Ig.
- El efecto de injerto contra leucemia se produce cuando se administran linfocitos T citotóxicos alogénicos o se realiza un trasplante de médula ósea alogénica junto con medidas para limitar la enfermedad de injerto contra huésped.
- Los anticuerpos monoclonales conjugados con fármacos, toxinas o isótopos radiactivos pueden señalar células o antígenos tumorales presentes en los vasos sanguíneos nuevos o los fibroblastos reactivos de la estroma asociados con una neoplasia maligna. Se lograron resultados terapéuticos imponentes con el empleo de anticuerpos contra CD20 en el linfoma de células B, contra CD33 en la leucemia mieloide, anti-MUC-1 en el cáncer de ovario y contra c-erbB2 sobreexpresado en los cánceres de mama. Los anticuerpos bifuncionales pueden permitir que ciertos efectores como las células NK y las células T citotóxicas se acerquen a la diana tumoral.

LECTURAS ADICIONALES

Ancrile B.B., O'Hayer KM. & Counter C.M. (2008) Oncogenic Ras-induced expression of cytokines: a new target of anti-cancer therapeutics. Molecular Interventions 8, 22–27.

Banchereau J. & Palucka A.K. (2005) Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. Nature Reviews Immunology 5, 296–306.

Begent R.H.J. et al. (1996) Clinical evidence of efficient tumor targeting based on single-chain Fv antibody selected from a combinatorial library. Nature Medicine 2, 979–984.

Chen R., Alvero A.B., Silasi D.A., Steffensen K.D. & Mor G. (2008) Cancers take their Toll—the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells. Oncogene 27, 225–233.

Finn O.J. (2008) Tumor immunology top 10 list. Immunological Reviews 222, 5–8.

Ho W.Y. et al. (2003) Adoptive immunotherapy: engineering T-cell responses as biologic weapons for tumor mass destruction. Cancer Cell 3, 431–437.

Kahn J.A. (2009) HPV vaccination for the prevention of cervical intraepithelial neoplasia. New England Journal of Medicine 361, 271–278.

Karin M., Lawrence T. & Nizet V. (2006) Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. Cell 124, 823–835.

Lake R.A. & Robinson B.W.S. (2005) Immunotherapy and chemotherapy: a practical partnership. Nature Reviews Cancer 5, 397–405.

Lin W.W. & Karin M. (2007) A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. Journal of Clinical Investigation 117, 1175–1183.

Loo D.T. & Mather JP. (2008) Antibody-based identification of cell surface antigens: targets for cancer therapy. Current Opinion in Pharmacology 8, 627–631.

Muranski P. & Restifo N.P. (2009) Adoptive immunotherapy of cancer using CD4+ T cells. Current Opinion in Immunology 21, 200–208.

Murphy A. et al. (2005) Gene modification strategies to induce tumor immunity. Immunity 22, 403–414.

Payne G. (2003) Progress in immunoconjugate cancer therapeutics. Cancer Cell 3, 207–212.

Rafii S. (2002) Vaccination against tumor neovascularization: promise and reality. Cancer Cell 2, 429–431.

Rabinovich G.A., Gabrilovich D. & Sotomayor E.M. (2007) Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. Annual Review of Immunology 25, 267–296.

Reichert J.M. & Valge-Archer, V.E. (2007) Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. Nature Reviews Drug Discovery 6, 349–356.

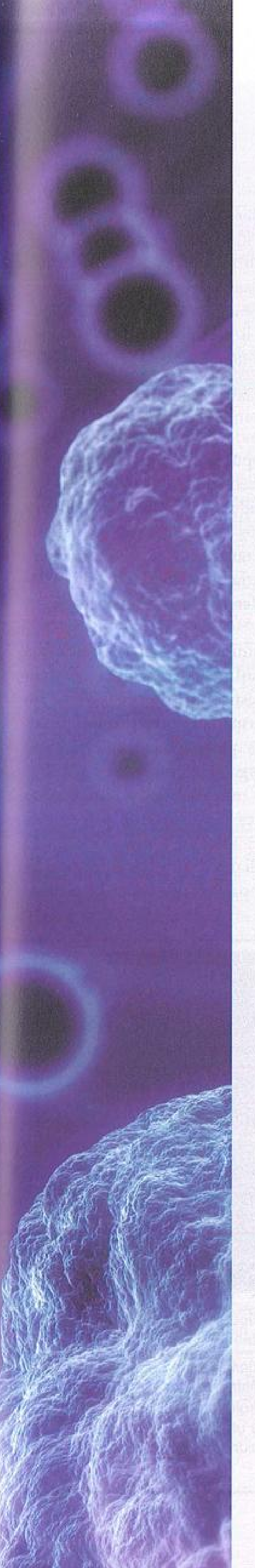
Rosenberg S.A., Yang J.C. & Restifo N.P. (2004) Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. Nature Medicine 10, 909–915.

Ruoslahti E. & Rajotte D. (2000) An address system in the vasculature of normal tissues and tumors. Annual Review of Immunology 18, 813–827.

Smyth M.J. Godfrey D.I. & Trapani J.A. (2001) A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. Nature Immunology 2, 293–299.

Srivastava P.K. (2000) Immunotherapy of human cancer: lessons from mice. Nature Immunology 1, 363–366.

Zou W. (2005) Immunosuppressive networks in the tumor environment and their therapeutic relevance. Nature Reviews Cancer 5, 263–274.



CAPÍTULO 18
Enfermedades autoinmunitarias

Conceptos clave

A modo de resumen...

Aunque muchas de las respuestas inmunitarias son beneficiosas porque reclutan anticuerpos, complemento, células fagocíticas, linfocitos, etc., para eliminar agentes patógenos infecciosos, a veces la inmunidad se dirige inadvertidamente contra antígenos que no representan una amenaza. La palabra hipersensibilidad se utiliza a menudo para describir este tipo de reacciones, que incluyen las respuestas de daño tisular frente a lo que deberían ser antígenos ambientales inocuos, como se observa en la alergia, y el rechazo de tejido extraño introducido en el cuerpo en los trasplantes. Es evidente que los mecanismos que generan diversidad implicados en la recombinación de los genes del receptor para el antígeno V(D)J de los linfocitos tienen el potencial de dar lugar al reconocimiento específico de casi cualquier antígeno. Un inconveniente de esta flexibilidad es que algunos de los receptores para el antígeno que se producen son capaces de reconocer nuestros componentes propios del cuerpo: los antígenos propios. En general, las células autorreactivas que son potencialmente patógenas (p. ej., aquellas con receptores de alta afinidad) son "eliminadas" por los mecanismos de tolerancia central y periférico, lo que da por resultado la eliminación clonal y la anergia clonal o la restricción por las células T reguladoras.

Roitt's Essential Immunology, Twelfth Edition. Peter J. Delves, Seamus J. Martin, Dennis R. Burton, Ivan M. Roitt.

Introducción

En cada individuo hay cierto grado de reconocimiento de lo propio. En realidad, se requieren células T positivamente seleccionadas en el timo para el reconocimiento del **CMH propio**. Además de las células B autorreactivas y las células T reactivas con el péptido propio + CMH propio, en nuestra circulación se pueden detectar **autoanticuerpos** (es decir, anticuerpos capaces de reaccionar con componentes propios). En personas sin enfermedad autoinmunitaria, estos son sobre todo autoanticuerpos IgM de baja afinidad, a menudo producidos por células B-1 CD5+ como parte del espectro de anticuerpos "naturales". El término **enfermedad autoinmunitaria** se aplica cuando la **autoinmunidad** da por resultado una **patología**. De hecho, la autoinmunidad no patológica puede colaborar con la eliminación de moléculas y células dañadas o agotadas. Por lo tanto, un bajo nivel de autoinmunidad parece ser la norma y en general no produce enfermedad. Sin embargo, si la tolerancia inmunitaria fracasa en eliminar o controlar los linfocitos autorreactivos patógenos, entonces aparece una enfermedad autoinmunitaria.

Espectro de las enfermedades autoinmunitarias

Una minoría sustancial de personas, que se estima en el 5-8% de la población, desarrolla una enfermedad autoinmunitaria. Una vez que esto sucede, en la mayoría de los casos estas enfermedades permanecen de por vida. Mientras que algunas son de naturaleza relativamente leve, muchas se asocian con una morbimortalidad significativa.

No siempre está claro si una entidad clínica particular es en realidad una "enfermedad autoinmunitaria" o una enfermedad cuya causa principal no es un ataque autoinmunitario, pero que, no obstante, está asociada con el fenómeno autoinmunitario (Cuadro 18.1). Más adelante en este capítulo describiremos estas enfermedades, como la ateroesclerosis y la psoriasis. También hay un número de enfermedades autoinflamatorias, como los síndromes de fiebre periódica hereditaria, caracterizadas por la **ausencia** de títulos elevados de autoanticuerpos o células T específicas para el autoantígeno. Estas enfermedades se producen por el funcionamiento defectuoso de los componentes de sistema inmunitario innato y, por lo tanto, no dependen de una falla de la tolerancia inmunitaria específica, que está estrechamente implicada en las enfermedades autoinmunitarias clásicas.

En las enfermedades autoinmunitarias convencionales, la distribución tisular del **autoantígeno** determina en gran medida si la enfermedad es "**específica de órgano**" o "**no específica de órgano**". La **enfermedad de Hashimoto** es un ejemplo en el que los antígenos que se reconocen están bastante restringidos a un único órgano, en este caso la glándula tiroides (Figura 18.1a). Hay una lesión específica en esta glándula endocrina que implica la infiltración por células mononucleares (linfocitos, macrófagos y plasmocitos), la destrucción de las células epiteliales tiroideas y la formación de un centro germinativo acompañada por la producción de

Cuadro 18.1. Criterios de clasificación para las enfermedades autoinmunitarias. No es necesario que se cumpla la totalidad de estos criterios, ya que a menudo no es posible demostrar con claridad la transferencia de enfermedad con suero, linfocitos o ambos autorreactivos en los seres humanos.

Indicaciones de que una enfermedad es autoinmunitaria
Presencia de títulos elevados de autoanticuerpos, de linfocitos autorreactivos o de ambos *in vivo*
Unión del autoanticuerpo, de la célula T reactiva o de ambos al autoantígeno *in vitro*
Transferencia de la enfermedad con suero autorreactivo, con linfocitos autorreactivos o con ambos
Inmunopatología compatible con procesos mediados por mecanismos autoinmunitarios
Efecto beneficioso de las intervenciones inmunosupresoras Exclusión de otras posibles causas de enfermedad
Asociación CMH
Modelo animal que imita la enfermedad humana

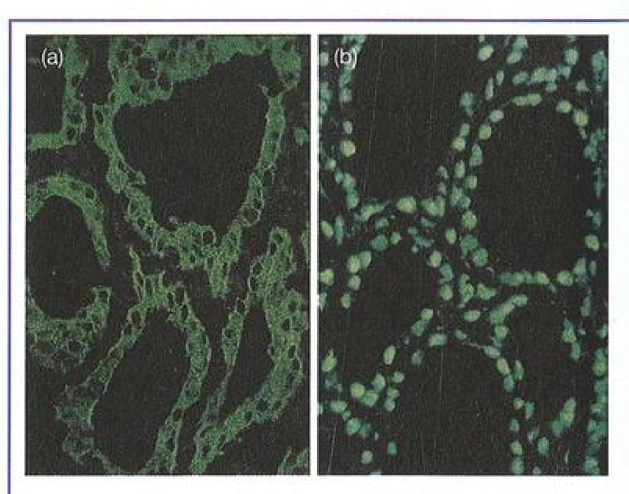


Figura 18.1. Estudios con anticuerpos fluorescentes en enfermedades autoinmunitarias.

a) Anticuerpos contra la peroxidasa tiroidea que tiñe el citoplasma de las células epiteliales tiroideas. b) Tinción nuclear difusa en un corte de tiroides obtenida con anticuerpos contra la nucleoproteína de un paciente con lupus eritematoso sistémico. (Proporcionada por cortesía de F. Bottazzo.)

Avances y descubrimientos 18.1—Descubrimiento de la autoinmunidad tiroidea

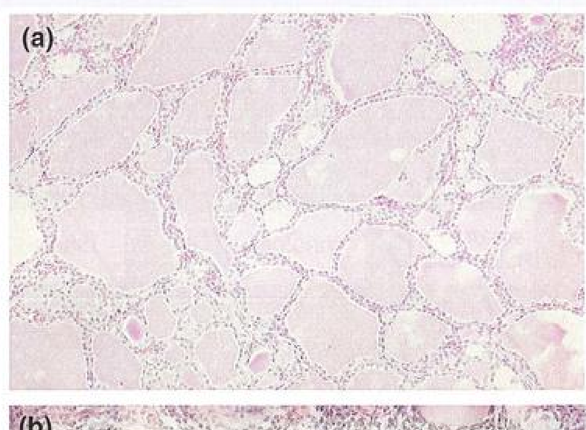
Hace más de un siglo que Sergei Metalnikoff, en los años 1900, informó que algunos animales machos eran capaces de producir anticuerpos que reconocían a sus propios espermatozoides. Sin embargo, estos anticuerpos no eran patógenos y la opinión del muy respetado Paul Ehrlich acerca de que el cuerpo no produciría respuestas inmunitarias nocivas contra lo propio (una situación que él denominó "*horror autotoxicus*") fue en ese momento ampliamente aceptada. Sin embargo, hubo informes posteriores de autoinmunidad contra los eritrocitos (Donath y Landsteiner, 1904) y el cristalino (Krusius, 1910). En la década de los años 1930, Thomas Rivers y sus colaboradores desarrollaron el modelo de encefalomielitis alérgica experimental (EAE) y proporcionaron pruebas de que las células inmunitarias pueden atacar el cerebro.

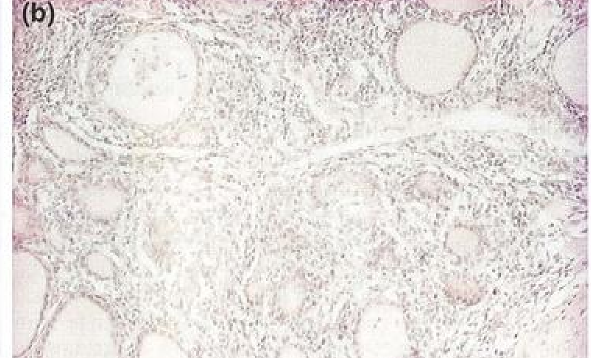
No obstante, durante la primera mitad de siglo xx hubo un escepticismo general respecto de la idea de que esa enfermedad podría surgir como resultado de la autoinmunidad. Sin embargo, durante la década de 1940 se publicaron más informes de lo que parecía ser la patología autoinmunitaria. Por último, hubo un convencimiento de los escépticos restantes en 1956 cuando, de manera sorprendente, tres publicaciones muy importantes de los rincones más alejados del mundo establecieron un vínculo entre autoinmunidad y patología en la tiroides.

Noel Rose y Ernest Witebsky en Boston (Estados Unidos) inmunizaron conejos con extracto de tiroides de conejos en adyuvante completo de Freund. Aunque se podría aventurar que el procedimiento causó la consternación de Witebsky y la alegría de Rose, permitió la producción de autoanticuerpos contra la tiroides y la destrucción inflamatoria crónica de la arquitectura de la glándula (Figura A18.1.1a,b).

Con la observación de la disminución de la γ globulina sérica tras la eliminación del bocio en la tiroiditis de Hashimoto y la similitud de la histología (Figura A18.1.1c) a la de los conejos de Rose y Witebsky, Ivan Roitt, Deborah Doniach y Peter Campbell en Londres (Reino Unido) comprobaron la hipótesis de que los plasmocitos en la glándula podría estar formando un anticuerpo contra un componente de la tiroides que, por esto, causando daño tisular y respuesta inflamatoria crónica. Por supuesto, los sueros de los primeros pacientes probados tenían anticuerpos precipitantes frente a un autoantígeno en los extractos de tiroides normal que pronto fue identificado como tiroglobulina (Figura A18.1.2).

Por último, en Dunedin (Nueva Zelandia), Duncan Adams y Herbert Purves buscaban un factor circulante que podría ser responsable del hipertiroidismo de la enfermedad de Graves. Estos autores inyectaron suero del paciente en cobayos en quienes se habían marcado con anterioridad sus glándulas tiroides con ^{131}I y se determinó el tiempo la liberación del material radiomarcado por la glándula. Mientras que la hormona hipofisaria natural estimulante de la tiroides (tirotropina, TSH) reveló un pico máximo de radiactividad del suero alrededor de las 4 horas después de la inyección de los animales de experimentación, el suero de los pacientes con enfermedad de Graves tuvo un efecto estimulador prolongado (Figura A18.1.3). Al final se demostró que el llamado estimulador tiroideo de acción prolongada (LATS) era una IgG que imita la TSH al reaccionar con el receptor para TSH, pero que difieren en la evolución temporal de la acción, en gran parte debido a su semivida más prolongada en la circulación.





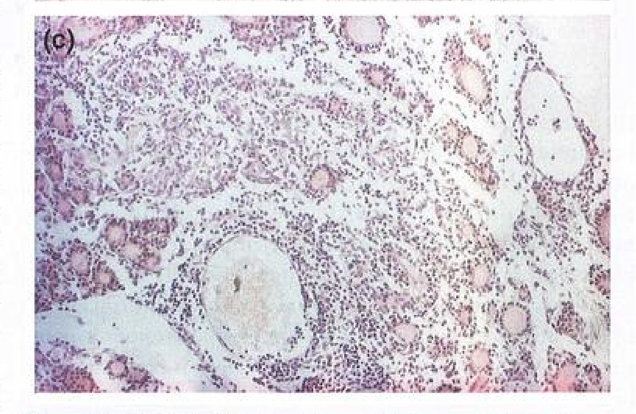


Figura A18.1.1. Tiroiditis autoinmunitaria experimental.

a) Arquitectura folicular de la tiroides normal.
b) Tiroiditis producida por inmunización con extracto tiroideo de rata en adyuvante completo de Freund; las células inflamatorias crónicas invasoras han destruido la estructura folicular. (Basado en los experimentos de Rose N.R. y Witebsky E. [1956] *Journal de immunology* ***76***, 417-427.) c) Similitud de lesiones en la enfermedad autoinmunitaria espontánea humana con las inducidas en el modelo experimental.

Avances y descubrimientos 18.1—*(Continuación)*

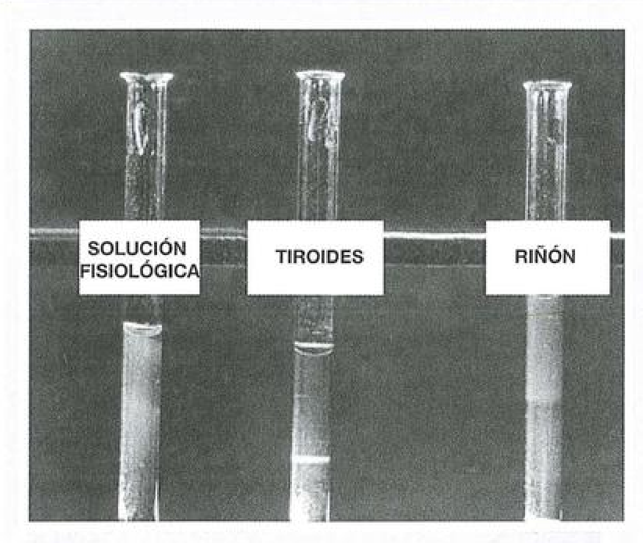


Figura A18.1.2. Autoanticuerpos tiroideos en el suero de un paciente con enfermedad de Hashimoto demostrada por precipitación en agar.

El suero de prueba es incorporado en agar en el fondo del tubo; la capa media sólo contiene agar, mientras que el autoantígeno se halla en la capa superior. A medida que los anticuerpos séricos y los autoantígenos tiroideos difunden unos hacia los otros, forman una zona opaca de precipitación en la capa media. Los controles con solución fisiológica y extracto de riñón son negativos. (Basada en Roitt I.M., Doniach D., Campbell P.N. y Hudson R.V. [1956] *Lancet* ii, 820-821.)

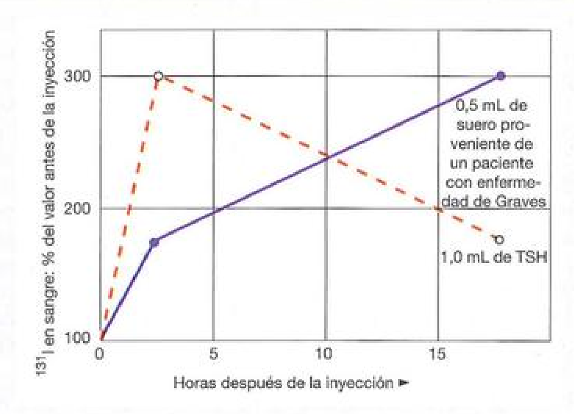


Figura A18.1.3. Estimulador de la tiroides de acción prolongada en la enfermedad de Graves.

La inyección de TSH causa la liberación rápida de ^{131}I de la tiroides del animal en el que se efectuó marcación previa, a diferencia de la liberación prolongada después de la inyección del suero de un paciente con enfermedad de Graves. (Basado en Adams D.D. y Purves H.D. [1956] *Proceedings of the University of Otago Medical School* **34**, 11-12.)

anticuerpos circulantes que son específicos para los antígenos tiroideos (Avances y descubrimientos 18.1). En algunos otros trastornos, sin embargo, la lesión tiende a localizarse en un solo órgano, a pesar de que los anticuerpos no son específicos de órgano. Un buen ejemplo sería la **cirrosis biliar primaria**, en la que los conductillos biliares pequeños constituyen el sitio de acción principal de la infiltración de células inflamatorias, si bien los anticuerpos séricos presentes, sobre todo los antimitocondriales, no son específicos del hígado.

Las enfermedades autoinmunitarias no específicas de órgano, como indica su nombre, son sistémicas en cuanto a su naturaleza y a menudo tienen un componente reumático. El **lupus eritematoso sistémico** (LES) es un excelente ejemplo en el que están presentes anticuerpos antinucleares (ANA) que reaccionan con el núcleo de todos los tipos de células (Figura 18.1b) y las lesiones no se limitan a un solo órgano. Los cambios patológicos son generalizados y se observan en la piel (la característica erupción en la cara en "ala de mariposa lúpica"), los glomérulos renales, las articulaciones, las serosas, las células de la sangre y los vasos sanguíneos.

En el Cuadro 18.2 se enumeran algunas de las enfermedades más frecuentes y sus autoanticuerpos asociados. Gran parte de nuestra comprensión de la enfermedad autoinmunitaria y del desarrollo de tratamientos nuevos y eficaces surgió del estudio de modelos animales (Cuadro 18.3).

Superposición de los trastornos autoinmunitarios

Se observa una tendencia a la producción de más de una enfermedad autoinmunitaria en el mismo individuo, y cuando ello sucede, la asociación tiene lugar a menudo (pero no siempre) entre enfermedades que pertenecen a la misma región del espectro autoinmunitario: específicas o no específicas de órgano. Así, los pacientes con tiroiditis de Hashimoto presentan una incidencia mucho más elevada de anemia perniciosa de la que podría esperarse para una población al azar del mismo sexo y la misma edad (10 versus 0,2%). En cambio, tanto la tiroiditis de Hashimoto como la enfermedad de Graves se diagnostican en pacientes con anemia perniciosa con una frecuencia inesperadamente elevada. Se observan otras asociaciones entre la enfermedad de Addison (una enfermedad autoinmunitaria que afecta la glándula suprarrenal) y la enfermedad tiroidea autoinmunitaria, y así sucesivamente.

Hay una superposición aún mayor en los resultados serológicos. El 30% de los pacientes con enfermedad tiroidea autoinmunitaria también tiene anticuerpos en el suero, que se detectan fácilmente contra la célula parietal (que se encuentran en pacientes con anemia perniciosa). Es de destacar que estos anticuerpos no reaccionan en forma cruzada. Los anticuerpos específicos de la glándula tiroides no reaccionarán con el estómago y viceversa. Cuando un suero reacciona con ambos órganos significa que están presentes

Cuadro 18.2. Principales enfermedades autoinmunitarias. Este listado incluye sólo aquellas enfermedades para las cuales hay evidencias firmes de que la causa principal de la patología es un ataque autoinmunitario. Otras enfermedades que también pueden ser autoinmunitarias, pero en las que se requiere mayor investigación respecto de la contribución de la autoinmunidad, se describen más adelante.

Enfermedad	Prevalencia (%)	Autoanticuerpos característicos
Enfermedad de Graves	1,12	Receptor para TSH (estimulador)
Artritis reumatoide	0,92	Proteínas citrulinadas, Fc de IgG
Enfermedad de Hashimoto	0,55	Peroxidasa tiroidea, tiroglobulina
Síndrome de Sjögren	0,37	SS-A, SS-B
Anemia perniciosa	0,15	Factor intrínseco
Esclerosis múltiple	0,14	Proteína básica mielina
Espondilitis anquilosante	0,13	Proteínas de varios tejidos conectivos y esqueléticos
Diabetes tipo 1	0,12	Ácido glutámico descarboxilasa 65, insulina, IA-2
Lupus eritematoso sistémico	0,08	dsDNA, Sm, U1RNP, SS-A, SS-B, histonas

las dos poblaciones de anticuerpos, una con especificidad para la tiroides y la otra para el estómago.

La enfermedad autoinmunitaria sistémica como SLE se asocia, desde el punto de vista clínico, con varios de otros trastornos como la artritis reumatoide (AR) y el síndrome de Sjögren. Los anticuerpos antinucleares y anti-IgG (factor reumatoideo) son una característica general.

¿Qué causa la enfermedad autoinmunitaria?

Factores genéticos

Los fenómenos autoinmunitarios tienden a acumularse en determinadas familias. Por ejemplo, los familiares en primer grado (hermanos, padres e hijos) de pacientes con enfermedad de Hashimoto tienen una incidencia elevada de autoanticuerpos contra la tiroides y de tiroiditis manifiesta o subclínica. Estudios paralelos revelaron relaciones semejantes en las familias de los pacientes con anemia perniciosa, en las que se detectan anticuerpos contra las células parietales gástricas en los individuos susceptibles de desarrollar aclorhidria y gastritis atrófica. En relación con el LES, el hermano de un paciente con esta enfermedad tiene una probabilidad 20 veces mayor de desarrollar lupus en comparación con la población general. En la Figura 18.2 se muestra una familia con más de un caso de diabetes tipo 1 en la que la enfermedad se relaciona con un haplotipo HLA particular definido por serología (véase más adelante).

Estas relaciones familiares se podrían atribuir a factores ambientales como microorganismos infecciosos, pero hay evidencia de peso que avala la participación de componentes genéticos importantes. Los datos acerca de **gemelos** son inequívocos. Cuando se desarrolla enfermedad de Graves o diabetes tipo 1 (insulinodependiente) en gemelos, se observa una **tasa de concordancia** (es decir, ambos gemelos afectados) mucho más elevada en los gemelos idénticos que en

Cuadro 18.3. Modelos animales de enfermedad autoinmunitaria espontánea e inducida. Algunos ejemplos de entre el gran número de estos modelos. CFA, adyuvante completo de Freund.

Modelo animal	Equivalente en seres humanos
Espontánea	
Ratón diabético no obeso (NOD, *Nonobese diabetic mouse*)	Diabetes tipo 1
Pollo de la cepa Obesa	Enfermedad de Hashimoto
Rata transgénica HLA-B27	Espondilitis anquilosante
Ratón NZB	Anemia hemolítica autoinmunitaria
NZB × NZW F1	Lupus eritematoso sistémico
Ratón MRL/*lpr*	Lupus eritematoso sistémico
Inducida (mediante la inyección de antígenos) Tiroiditis autoinmunitaria experimental (TAE) Tiroglobulina en adyuvante completo de Freund en ratones	Enfermedad de Hashimoto
Encefalomielitis autoinmunitaria experimental (EAE) Proteína básica mielina en adyuvante completo de Freund en ratones	Esclerosis múltiple
Artritis adyuvante *Mycobacterium tuberculosis* en adyuvante completo de Freund en ratas	Artritis reumatoide
Artritis inducida por colágeno Colágeno de tipo II de rata en adyuvante completo de Freund en ratones	Artritis reumatoide
Anemia hemolítica autoinmunitaria. Eritrocitos de rata en ratones	Anemia hemolítica autoinmunitaria

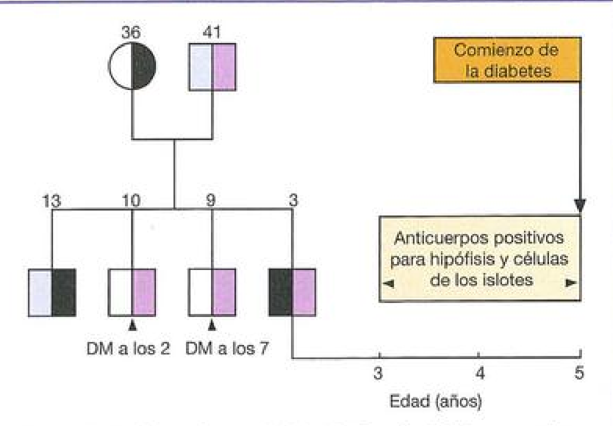


Figura 18.2. Ligamiento del haplotipo del HLA y comienzo de la diabetes tipo I (DM).

Haplotipos: □ A3, B14, DR6; ■ A3, B7, DR4; □ A28, B51, DR4; y ■ A2, B62, C3, DR4. La enfermedad se relaciona con la posesión de los haplotipos A2, B62, C3 y DR4. El hermano de 3 años presentó anticuerpos fijadores de complemento contra la superficie de las células de los islotes 2 años antes de desarrollar la diabetes franca, lo cual indica lo prolongado del proceso patológico que precedió al establecimiento de la enfermedad. (Datos proporcionados por G.F. Bottazzo.)

quienes no lo son. En segundo lugar, se advirtió el desarrollo de líneas de animales con enfermedades autoinmunitarias espontáneas (Cuadro 18.3). En otras palabras, **la autoinmunidad está genéticamente programada.** Una cepa de pollos obesos con tiroiditis autoinmunitaria, la cepa de ratón diabético no obeso (NOD) que sirve como modelo de diabetes tipo 1 en el ser humano y la cepa New Zealand Black (NZB) que desarrolla anemia hemolítica autoinmunitaria ilustran estos conceptos. El hibrido de NZB con otra cepa, la New Zealand White (hibrido B × W) de hecho desarrolla anticuerpos antinucleares como anti-dsDNA y glomerulonefritis mortal inducida por complejos inmunitarios, ambos elementos claves del LES humano.

Por mucho, la enorme mayoría de enfermedades autoinmunitarias implica múltiples genes de susceptibilidad en cada paciente, es decir, son **poligénicas.** Hay algunos casos extremadamente raros en los que la mutación heredada se observa en genes aislados, como *Foxp3* (que produce IPEX, desregulación *i*nmunitaria, *p*oliendocrinopatía y *e*nteropatía ligadas al cromosoma *X*), *AIRE* (que causa síndrome poliendocrino-1) o en *Fas* o *ligando Fas* (síndrome linfoproliferativo autoinmunitario). En consecuencia, estas enfermedades se clasifican como inmunodeficiencias primarias y ya se mencionaron en el Capítulo 14. Alguna idea acerca de la complejidad genética mucho mayor de las enfermedades autoinmunitarias convencionales se obtuvo a partir de las investigaciones de los genes de susceptibilidad. Este enfoque permitió identificar hasta ahora la participación de alrededor de 20 locus de genes para la diabetes tipo 1 en ratones NOD y cerca de 25 para el LES murino. En general, tanto en seres humanos como en ratones, cada gen aislado sólo confiere un pequeño aumento del riesgo. Es la **combinación** de estos genes la que provoca una posibilidad sustancialmente mayor de desarrollar la enfermedad autoinmunitaria.

Cuadro 18.4. Asociación del HLA con la enfermedad autoinmunitaria. Riesgo relativo se refiere a la posibilidad de desarrollar la enfermedad en comparación con un individuo que carece del alelo; los estudios típicos se realizaron en poblaciones de raza blanca. A menudo, las asociaciones difieren en los otros grupos étnicos.

Enfermedad	Alelo del HLA	Riego relativo
Asociada con las moléculas de clase II		
Enfermedad de Hashimoto	*DR5*	3,2
Enfermedad de Graves	*DR3*	3,7
Diabetes tipo 1	*DQ8* *DQ2* + *DQ8* *DQ6*	14 20 0,2
Enfermedad de Addison	*DR3*	6,3
Artritis reumatoide	*DR4*	5,8
Síndrome de Sjögren	*DR3*	9,7
Esclerosis múltiple	*DR2*	3
Asociada con las moléculas de clase I		
Espondilitis anquilosante	*B27*	87,4
Miastenia grave	*B8*	3

Las asociaciones genéticas más poderosas con las enfermedades autoinmunitarias se relacionan con el **complejo mayor de histocompatibilidad** (CMH): el HLA en los seres humanos y el H-2 en los ratones. De los numerosos ejemplos de este tipo, se pueden citar el aumento del riesgo de diabetes tipo 1 en los individuos con DQ8 y la incidencia más elevada de DR3 en los pacientes con enfermedad de Addison y de DR4 en los que experimentan artritis reumatoide (Cuadro 18.4). Debe señalarse que esta asociación varía con la raza; como ejemplo, HLA-B27 muestra una relación inusualmente firme con la espondilitis anquilosante y está presente en el 95% de los pacientes de raza blanca, pero sólo en el 50% de los pacientes estadounidenses de raza negra con esta enfermedad.

El uso de anticuerpos para definir especificidades del CMH es un método informativo, pero con las mejoras en la precisión gracias al empleo de secuenciación génica se hizo evidente que hay una variación enorme dentro de cada uno de los alelos definidos por anticuerpos. Así, la nomenclatura de los alelos del HLA puede tornarse bastante complicada. Sin embargo, en 2010 se adoptó una nomenclatura estandarizada y puede encontrarse una explicación detallada muy clara en http://hla.alleles.org/nomenclature. De esta forma, utilizando de nuevo el HLA-B27 como ejemplo, la acumulación de datos de secuencia provenientes de diferentes individuos condujeron rápidamente a una apreciación de que hay muchas variantes diferentes de HLA-B27 que confieren grados diferentes de

susceptibilidad. Sólo para tomar tres ejemplos: la variante alélica HLA-B*27:04 está más firmemente asociada con la espondilitis anquilosante que la HLA-B*27:05, mientras que el alelo HLA B*27:06 muestra sólo asociación muy débil o ninguna. A medida que se acumulan más datos, se tornan más claras las variantes precisas que constituyen los genes de susceptibilidad de la enfermedad. Algunas de las asociaciones del CMH observadas se deben al desequilibrio de la relación con el gen de susceptibilidad de una enfermedad, heredado *en bloque* con la variante del CMH. Sin embargo, suele ser el caso en que es el gen del CMH en sí el que conduce a un aumento o a una disminución del riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmunitaria determinada. Incluso la diferencia de un único aminoácido en la hendidura de unión al péptido tiene un impacto intenso en el espectro de péptidos que son presentados, tanto propios como extraños. Así, un ácido aspártico en la posición 57 del residuo aminoacídico en la cadena β del HLA-DQ confiere resistencia, mientras que una alanina, una valina o una serina en esta posición confieren susceptibilidad a la diabetes tipo 1. La relación estrecha con el CMH no es totalmente inesperada dado que, como se verá después, las enfermedades autoinmunitarias son dependientes de las células T y la mayoría de las respuestas de células T está restringida por el CMH.

Entre la plétora de locus no relacionados con el CMH se encuentran los genes que codifican autoantígenos (p. ej., receptor para TSH, insulina), los receptores para el patrón de reconocimiento (p. ej., NOD2), citocinas (p. ej., IL-2, IL-12, IL-21) y sus receptores (IL-2R, IL-7R y IL 23R), moléculas coestimuladoras (p. ej., CD40), moléculas de señalización (p. ej., BLK, TRAF1) y factores de transcripción (p. ej., STAT4). Los polimorfismos en estos genes aumentan la susceptibilidad o conducen a la resistencia en personas predispuestas de algún modo, y algunos tienen el potencial de alterar el equilibrio de las subpoblaciones de células T reguladoras Th1/Th2/Th17. Es particularmente digno de atención cualquier polimorfismo identificado en más de una enfermedad autoinmunitaria; un buen ejemplo es el *CTLA-4*, ligado a varias de las enfermedades incluidas la diabetes tipo 1, la enfermedad de Graves y la artritis reumatoide. Las variantes de *PTPN22* también se han implicado en la susceptibilidad a éstas y varias otras enfermedades autoinmunitarias. Dado que tanto CTLA-4 de la superficie celular como la tirosina fosfatasa intracelular PTPN22 están implicadas en la inhibición de la coestimulación de las células T, quizás no sorprende que los defectos de su expresión o su función podrían contribuir con el desarrollo de las respuestas autoinmunitarias normalmente suprimidas.

El esclarecimiento de las afecciones poligénicas complejas es una tarea muy difícil. Si se considera al LES como arquetipo, los análisis genéticos de la predisposición a la enfermedad es más compatible con un modelo de exposición umbral que requiere contribuciones aditivas o epistáticas (suprimir la función de otro gen) de múltiples genes de susceptibilidad, relacionadas tal vez con diferentes etapas de la patogenia de la enfermedad (Figura 18.3).

Influencias hormonales

Si una persona pertenece al genotipo XX o al XY, esto tiene un efecto intenso en muchos aspectos de la vida, lo cual incluye la tendencia general de que la enfermedad autoinmunitaria suceda con mayor frecuencia en mujeres que en varones (Figura 18.4), tal vez como resultado, sobre todo, de las diferencias en los patrones hormonales. De hecho, en conjunto, el 75% de las enfermedades autoinmunitarias se observa en mujeres y la mayoría aparece en general durante los años de fecundidad. El sesgo de sexo más llamativo se observa en el LES donde, durante este período de su vida, las mujeres tienen una probabilidad 10 veces mayor de desarrollar esta enfermedad que los varones. Sin embargo, esta incidencia disminuye a sólo 2,5 veces después de la menopausia. Hay claves para sugerir que en estas pacientes hay concentraciones más altas de estrógenos en comparación con los controles. La desactivación génica de la cadena α del receptor para estrógenos en el modelo NZB × NZW disminuye las concentraciones de autoanticuerpos, reduce la gravedad de la glomerulonefritis y aumenta la supervivencia (Figura 18.5).

A menudo, el embarazo se asocia con una mejoría en la enfermedad autoinmunitaria, por ejemplo en la artritis reumatoide, y muchas veces se producen recidivas importantes después del parto, momento en el que hay modificaciones notables de ciertas hormonas como la prolactina, además de la pérdida de la placenta. Por cierto, la disminución general

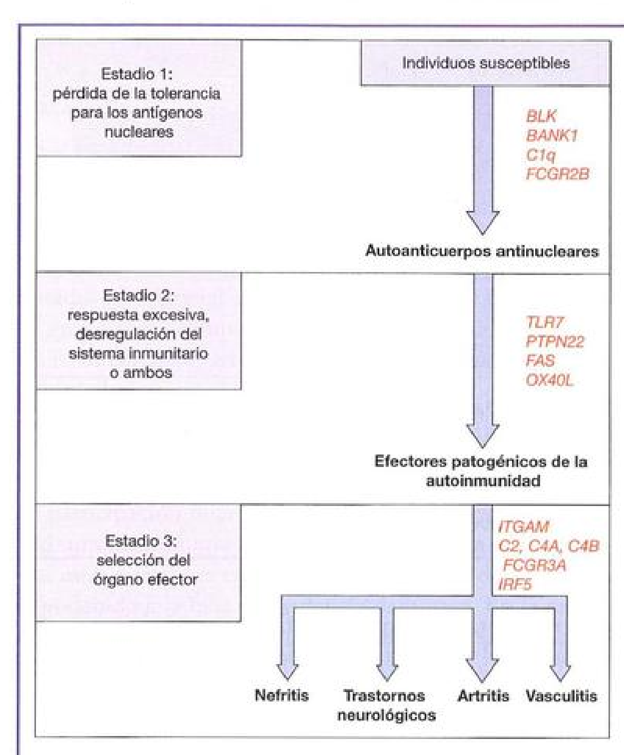


Figura 18.3. Posibles estadios del desarrollo del lupus eritematoso sistémico (LES) en individuos susceptibles.

A partir de estudios de asociación amplia del genoma, en el LES se han implicado entre 20 y 50 genes; algunos de estos ejemplos se indican en rojo. BLK, tirosina cinasa de linfocitos B; BANK1, proteína estructural de la célula B con repeticiones de ankirina-1; IRF5, factor regulador del interferón-5. El ITGAM codifica la integrina α_M-, componente del receptor para el complemento CR3, FCGR2B codifica FcγRIIb y FCGR3A codifica FcγRIIIa.

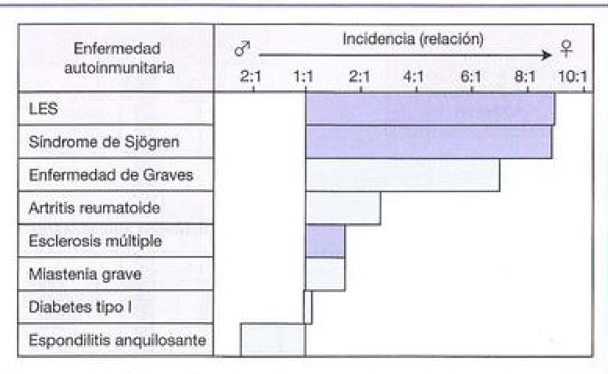


Figura 18.4. Mayor incidencia de enfermedad autoinmunitaria en las mujeres.

La espondilitis anquilosante es una de las escasas enfermedades que va en contra de la tendencia y es más frecuente en los hombres que en las mujeres.

de las respuestas inmunitarias a fin de evitar el rechazo inmunitario del feto sería coincidente con cierto grado de remisión de una enfermedad autoinmunitaria durante el embarazo. Sin embargo, se debe tener cierto grado de cautela en hacer cualquier afirmación general aquí, porque algunas enfermedades autoinmunitarias, como el lupus, en realidad pueden empeorar durante el embarazo. Puede ser que la contribución relativa de las diferentes subpoblaciones de células T en los diversos tipos de enfermedad autoinmunitaria y los cambios en estas subpoblaciones durante el embarazo permitan de alguna forma explicar estos efectos en apariencia opuestos.

En el Capítulo 10 vimos la importancia de la retroalimentación inmunitaria neuroendocrina, que abarca el circuito de control entre las citocinas, el hipotálamo, la hipófisis y la glándula suprarrenal. Se han detectado alteraciones en este circuito de retroalimentación en varios trastornos autoinmunitarios. Los pacientes con artritis reumatoide e inflamación crónica en curso presentan concentraciones normales de cortisol circulante, a pesar de que por la presencia de citocinas inflamatorias normalmente sería esperable la mayor secreción de hormona suprarrenal. La cepa de pollos obesos y varias cepas de ratones con lupus también muestran respuestas atemperadas de corticosteroides inducidos por IL-1.

¿Contribuye el medioambiente?

Estudios en gemelos

Las tasas de concordancia informadas en la literatura tienden a variar un poco entre los diferentes estudios, pero todas refuerzan la idea de que, aunque hay una firme contribución genética, los genes heredados no son toda la historia. Así, incluso el valor relativamente elevado del 65% en las tasas de concordancia informadas para el desarrollo de diabetes tipo 1 en gemelos idénticos seguidos a lo largo de la vida indica claramente que también deben estar implicados factores no hereditarios. Esto no se relaciona por completo con el medioambiente ya que, si bien los gemelos monocigotos tienen genes idénticos en la línea germinal de inmunoglobulinas y receptores de las células T (TCR), los procesos de diversificación de receptores y de interacciones internas antiidiotipo revisten una complejidad tal que los repertorios de receptores resultantes son muy variables y tienen pocas probabilidades de ser idénticos. No obstante, en muchas otras enfermedades autoinmunitarias, que incluyen la enfermedad de Graves y el LES, las tasas de concordancia informadas en gemelos idénticos son sólo del orden del 20-25%; esto permite intuir la participación de muchos otros

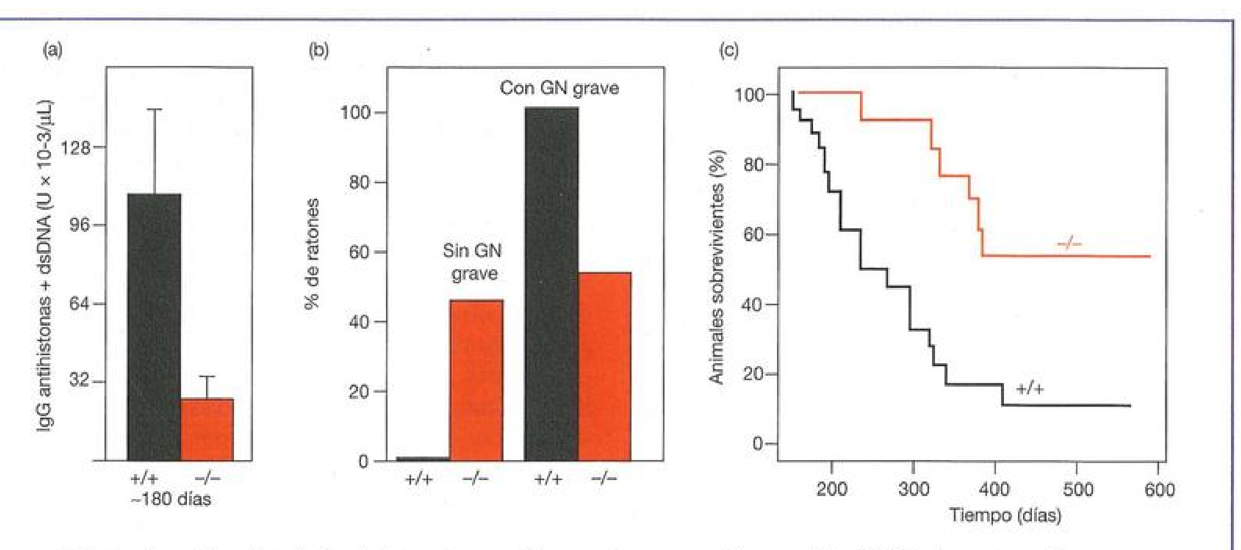


Figura 18.5. La desactivación génica de la cadena α del receptor para estrógeno (ERα) inhibe los autoanticuerpos y la nefritis, y prolonga la vida en el lupus murino.

Ratones hembras NZB × NZW F_1, que portan la deleción homocigota (-/-) de la cadena α del receptor para estrógeno: a) desarrollan concentraciones bajas de autoanticuerpos IgG contra una mezcla de histonas/dsDNA; b) muestran menor incidencia de glomerulonefritis (GN) en comparación con los hermanos $Er\alpha^{+/+}$ y c) tienen un período de vida mayor. (Basado en datos de Bynoté K. K. y cols. [2008] *Genes and Immunity* **9**, 137-152.)

factores contribuyentes. Si bien en parte influye la genética de la enfermedad autoinmunitaria, las influencias no genéticas se comprenden relativamente mal, en especial en los seres humanos.

Dieta

¿Qué agentes medioambientales se pueden identificar? Bueno, la dieta podría ser uno de ellos, si bien hasta ahora hay poca evidencia. Los aceites de pescado que contienen ácidos grasos poliinsaturados omega-3 tienen actividad antiinflamatoria, y en algunos estudios se demostró que son beneficiosos para los pacientes con artritis reumatoide. Sin embargo, en un metanálisis reciente (es decir, la combinación de resultados de diversos estudios) se concluyó que son necesarios ensayos clínicos mucho más grandes antes de arribar a conclusiones firmes respecto de las influencias de la dieta en esta enfermedad. Hay cierta evidencia respecto de que la suplementación con yodo en poblaciones deficientes de éste puede conducir a un aumento de enfermedad autoinmunitaria tiroidea.

Fármacos

Aunque en informes de casos muchas enfermedades autoinmunitarias se vincularon con una amplia variedad de fármacos, el ejemplo establecido con mayor firmeza es el **lupus inducido por fármacos**. La procainamida y la quinidina (utilizadas para el tratamiento de la arritmia cardíaca) y la hidralazina (un fármaco antihipertensivo) están con mayor frecuencia implicados en esta enfermedad que comparte muchas características con el LES, aunque la especificidad del anti-DNA tiende a ser hacia la forma de DNA de cadena simple en lugar del de cadena doble (dsDNA) y los pacientes tienden a sufrir más compromiso articular y menos neurológico y renal.

Agentes medioambientales no infecciosos

La luz solar es un factor desencadenante indiscutible de las lesiones cutáneas del LES. La necrosis y la apoptosis de los queratinocitos secundarias a los efectos perjudiciales de la luz solar conducen a la liberación de autoantígenos nucleares; en el caso de la apoptosis, éstos se asocian con la presencia de vesículas en la superficie de la célula que en general aparecen en esta tipo de muerte celular. La situación se complica aún más por el defecto en la fagocitosis observado en esta enfermedad, que da por resultado una reducción en la eliminación de los detritos de la apoptosis. La radiación UV también estimula la producción de las quimiocinas CCL y CXCL por las células epiteliales de la piel, lo que trae como consecuencia el reclutamiento de células T y células dendríticas en la lesión inflamatoria.

La exposición ocupacional a varios de los agentes se relacionó con el desarrollo de enfermedad autoinmunitaria. Asociaciones particularmente convincentes son la exposición al sílice con el LES, la artritis reumatoide y la esclerodermia. Los solventes se han implicado en la esclerosis múltiple, y los pesticidas en la artritis reumatoide. El tabaquismo aumenta el riesgo de artritis reumatoide y de las enfermedades de Hashimoto y de Graves. Los mecanismos siguen sin ser aclarados.

Infección

A menudo, la sospecha se dirige a un microorganismo infeccioso, y en realidad hay pruebas sustanciales en modelos animales de que la infección puede desempeñar una función importante en el desarrollo de la enfermedad autoinmunitaria. Sin embargo, hay un ejemplo claro en los seres humanos: la fiebre reumática aguda tras la infección por *Streptococcus* del grupo A. En el 3 a 4% de los pacientes no tratados, en general niños, la angina por la infección por *S. pyogenes* se acompaña de poliartritis, carditis y corea (es decir, inflamación articular y cardíaca junto con movimientos involuntarios). La relación con la infección se basa en que la proteína M estreptocócica comparte homología estructural con la miosina cardíaca, una situación clara de mimetismo molecular. A pesar de las numerosas propuestas de participación microbiana en la precipitación de enfermedad autoinmunitaria en individuos genéticamente propensos, estas relaciones están todavía en el nivel de la especulación debido a la falta de evidencia definitiva. En la mayoría de los casos de enfermedad autoinmunitaria humana, el problema respecto de la identificación de supuestos agentes infecciosos es el período de latencia prolongado que dificulta rastrear el episodio iniciador (véase la Figura 18.2) y, en segundo lugar, en general no pueden aislarse microorganismos viables de los tejidos afectados. No obstante, la evidencia clara de las influencias microbianas en los modelos animales es lo suficientemente convincente para sugerir que vale la pena continuar con la búsqueda de relaciones entre patógenos y enfermedades autoinmunitarias en los seres humanos.

La complejidad aumenta por el conocimiento de que los microorganismos medioambientales a veces pueden **proteger** contra la enfermedad autoinmunitaria espontánea. La incidencia de la diabetes se eleva considerablemente si los ratones NOD se mantienen en condiciones exentas de patógenos específicos, mientras que el virus Sendai inhibe el desarrollo de artritis en el modelo murino MRL/*lpr* de LES. La extraordinaria variación en la incidencia de diabetes en colonias NOD criadas en una amplia variedad de diferentes alojamientos para animales (Figura 18.6) refleja la notable influencia de la flora ambiental sobre la expresión de la enfermedad autoinmunitaria.

Mecanismos en la enfermedad autoinmunitaria

Aunque las respuestas innatas cumplen funciones importantes en el desarrollo y el mantenimiento de la enfermedad autoinmunitaria, al nivel patogénico más fundamental la autoinmunidad representa una ruptura en la tolerancia inmunitaria específica. Dado que la tolerancia es un mecanismo que se aplica sólo a los linfocitos, salta a la vista la contribución de la respuesta adaptativa. Obsérvese también que afirmamos la "ruptura" de la tolerancia. Puede ser que en algunos casos haya una falla para establecer la tolerancia en primer lugar, pero dado que a menudo las enfermedades autoinmunitarias no surgen hasta los comienzos de la mediana edad o después, parecería que la tolerancia funciona en un inicio de modo eficaz, pero que en individuos con

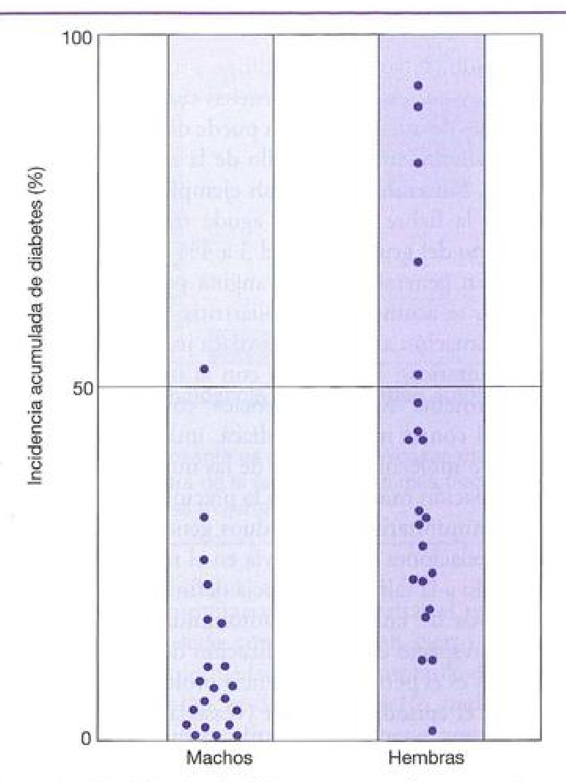


Figura 18.6. Incidencia de diabetes espontánea en colonias geográficamente separadas de ratones NOD de 20 semanas de edad.

Cada punto representa una sola colonia. La dispersión extrema de los valores no se atribuye en forma significativa a la deriva genética. Se pone de manifiesto la incidencia más baja de la enfermedad en los machos. (Datos adaptados de Pozzilli P. Signore A., Williams A.J.K. y Beales P.E. [1993] *Immunology Today* **14**, 193-196.)

predisposición genética influye la acumulación de factores medioambientales, y tal vez de mutaciones, que por último lleva a respuestas patógenas incontroladas contra lo propio. No siempre está totalmente claro si la respuesta es impulsada por un antígeno propio, un antígeno extraño, por superantígenos u otros activadores policlonales, o por antiidiotipos. También vale la pena recordar que una enfermedad autoinmunitaria aparentemente idéntica puede surgir por conjuntos diferentes de circunstancias en pacientes determinados.

La tolerancia no es absoluta

De los varios mecanismos de tolerancia empleados por el sistema inmunitario, sólo la apoptosis conduce a la pérdida de los linfocitos específicos para el antígeno. Si bien las células B de alta afinidad inducirán tolerancia por apoptosis, sobre todo contra los autoantígenos que circulan en concentración elevada, esta manera más extrema de tratar con linfocitos fuera de control está dirigida en gran medida a las células T durante la selección negativa en el timo. La corrección (edición) del receptor puede eliminar las células B autorreactivas a través de la recombinación V(D)J continua. Aquellas células B autorreactivas que están presentes en la periferia en general no plantean un problema debido a la falta de colaboración de células T cognadas (véase la Figura 11.16). Sin embargo, en el caso de autoantígenos que no son expresados en un nivel adecuado en el timo habrá células T autorreactivas. El procesamiento de un autoantígeno lleva a que ciertos péptidos (dominantes) se expresen de manera preferencial sobre las células presentadoras de antígeno (CPA), mientras que otros (crípticos) sólo aparecen en la hendidura del CMH en concentración muy baja que, si bien permite expandir sus células T cognadas en el contexto de la selección positiva tímica, puede fallar en proporcionar una señal lo suficientemente poderosa para la selección negativa de estas células. Como consecuencia, las células T autorreactivas específicas para **epítopos crípticos** sobreviven en el repertorio, pero presentarán una autorreactividad débil.

Respuestas dirigidas por el autoantígeno

Es poco probable que la cepa Obesa (OS) de pollos aparezca en el menú de un restaurant local, pero resulta de interés porque desarrolla espontáneamente autoanticuerpos IgG contra la tiroglobulina y una respuesta antitiroidea inflamatoria crónica que destruye la glándula y causa hipotiroidismo. Si se elimina la fuente de antígenos mediante tiroidectomía neonatal, no se forman autoanticuerpos. La inyección de tiroglobulina normal en estos animales induce anticuerpos. La tiroidectomía de los pollos OS con tiroiditis establecida es seguida por un descenso notable del título de anticuerpos. En conclusión, la inmunidad espontánea antitiroglobulina se inicia y se mantiene por la presencia de un autoantígeno de la glándula tiroides. Además, como la respuesta es dependiente de las células T, se puede inferir que tanto las células B como las T reaccionan con la tiroglobulina en este modelo.

Como es habitual, la enfermedad humana es difícil de manejar y se debe confiar en evidencias indirectas. Se establecieron líneas de células T procedentes de glándulas con enfermedad de Graves y se pudo demostrar la estimulación directa ejercida por las células tiroideas intactas. Después de la eliminación de la posible fuente de antígenos mediante tiroidectomía en los pacientes con tiroiditis de Hashimoto, se observa un descenso de la concentración sérica de gammaglobulinas, una de las claves que llevó al descubrimiento de la autoinmunidad tiroidea (véase Avances y descubrimientos 18.1); en forma incidental, esto concuerda con los datos de los pollos OS mencionados antes. Se considera que la producción de autoanticuerpos IgG de alta afinidad acompañada de hipermutación somática en pacientes con enfermedad autoinmunitaria tiroidea es una evidencia firme a favor de la selección de las células B por el antígeno en la respuesta dependiente de células T. La simple razón de esta afirmación es que los anticuerpos IgG de alta afinidad sólo se originan a través de mutación y selección inducida por el antígeno dentro de los centros germinativas. Un argumento más indirecto, pero igual de convincente, es que se forman regularmente anticuerpos contra un conjunto de epítopos sobre un solo autoantígeno o de autoantígenos dentro de un solo órgano (p. ej., tiroglobulina más peroxidasa tiroidea o diferentes constituyentes del nucleosoma). Resulta difícil proponer una hipótesis que no dependa en algún momento

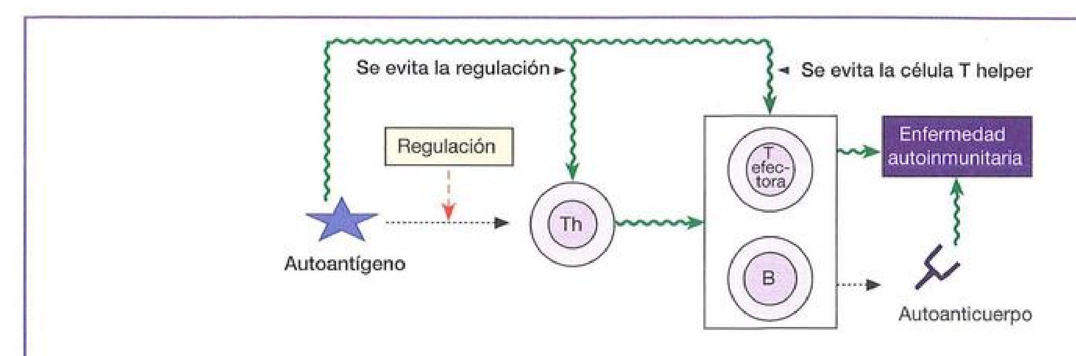


Figura 18.7. La autoinmunidad se origina por la evasión del control de la autorreactividad.

Las restricciones a la estimulación de las células T *helper* autorreactivas por autoantígenos se pueden resolver si se evita a la célula *helper* o se alteran los mecanismos reguladores.

de la estimulación por el antígeno. Las células T son esenciales para estas respuestas, ya que la depleción de las células T CD4 en varios modelos animales elimina la producción de autoanticuerpos.

Detección de autoantígenos por el sistema inmunitario

Para algunos pocos constituyentes del cuerpo (p. ej., espermatozoides, cristalinos y corazón), los antígenos son **secuestrados** (ocultados) por el sistema inmunitario y, por consiguiente, no se establece ningún grado de tolerancia inmunitaria. Esto no plantea un problema a menos que un contratiempo (p. ej., traumatismo físico) cause la liberación del antígeno en la circulación con la activación ulterior de linfocitos autorreactivos. Incluso aquí, en general la experiencia ha sido que la inyección de extractos *no modificados* de aquellos tejidos implicados en trastornos autoinmunitarios específicos de órgano no inducen fácilmente la formación de anticuerpos. De hecho, en la mayoría de los casos (p. ej., eritrocitos en la anemia hemolítica autoinmunitaria, la ribonucleoproteína [RNP] y los componentes del nucleosoma presentes como vesículas sobre la superficie de las células apoptósicas en el LES, y los receptores de superficie en muchos casos de autoinmunidad específica de órgano), los autoantígenos están fácilmente accesibles a los linfocitos circulantes.

Es probable que los antígenos presentes en concentraciones adecuadas en el líquido extracelular deban ser procesados por las células presentadoras de antígeno profesionales, pero, respecto de los autoantígenos asociados con células, los péptidos derivados sólo interactúan "en forma significativa" con células T específicas si hay moléculas de superficie del CMH apropiadas, si la concentración del péptido procesado asociado con ellas es apreciable y si pueden generarse señales coestimuladoras para las células T en reposo. Como se verá, éstas son limitaciones importantes.

El mensaje es que todos estamos parados sobre un campo minado de células autorreactivas, con acceso potencial a sus autoantígenos respectivos. Sin embargo, como la enfermedad autoinmunitaria sólo se produce en una minoría de la población, el organismo debe contar con mecanismos homeostáticos para evitar que estas células autorreactivas sean activadas en condiciones normales. Teniendo en cuenta estas limitaciones, en la Figura 18.7 se presenta un marco de referencia para examinar los medios con los que se podrían evadir esos mecanismos para que sea posible el desarrollo de la autoinmunidad. Se considera que la clave del sistema es el control de las células T *helper* autorreactivas, ya que las pruebas respaldan la dependencia de casi todas respuestas autoinmunitarias en las células T; por lo tanto, la consideración principal es la interacción entre la célula T y el péptido asociado con el CMH. Se parte de la presunción de que en condiciones normales estas células no son capaces de responder debido a deleción clonal, anergia clonal, supresión de las células T o presentación inadecuada de los autoantígenos. En una visión inmediata, se podría concebir un grado *anormal* de capacidad de respuesta como resultado de una expresión intratímica relativamente baja de una molécula específica. Las alteraciones en las vías de señalización que afectan los umbrales para la selección positiva y negativa en el timo también afectarían la capacidad de respuesta posterior a los autoantígenos periféricos. Esto también se relacionaría con defectos en la muerte celular por apoptosis.

Obtención de colaboración de la célula T para las células B específicas para el autoantígeno

Allison y Weigle afirmaron, en forma independiente, que si las células T autorreactivas se volvían tolerantes y en consecuencia eran incapaces de colaborar con las células B para generar autoanticuerpos (Figura 18.8a), la provisión de nuevos determinantes transportadores (es decir, los epítopos de célula T *helper*) contra los cuales la autotolerancia no había sido establecida podía sortear este mecanismo y permitir la producción de autoanticuerpos (Figura 18.8b).

Modificación del autoantígeno

Se podría originar un nuevo transportador a través de la modificación postraduccional de la molécula (Figura 18.8b.1), lo cual se observa por ejemplo en la citrulinación (modificación postraduccional de la arginina) de la vimentina, el fibrinógeno, el colágeno de tipo II y la α enolasa en la artritis reumatoide. También se puede llevar a cabo la modificación mediante la combinación con un fármaco (Figura 18.8b.3). Un ejemplo revela que la anemia hemolí-

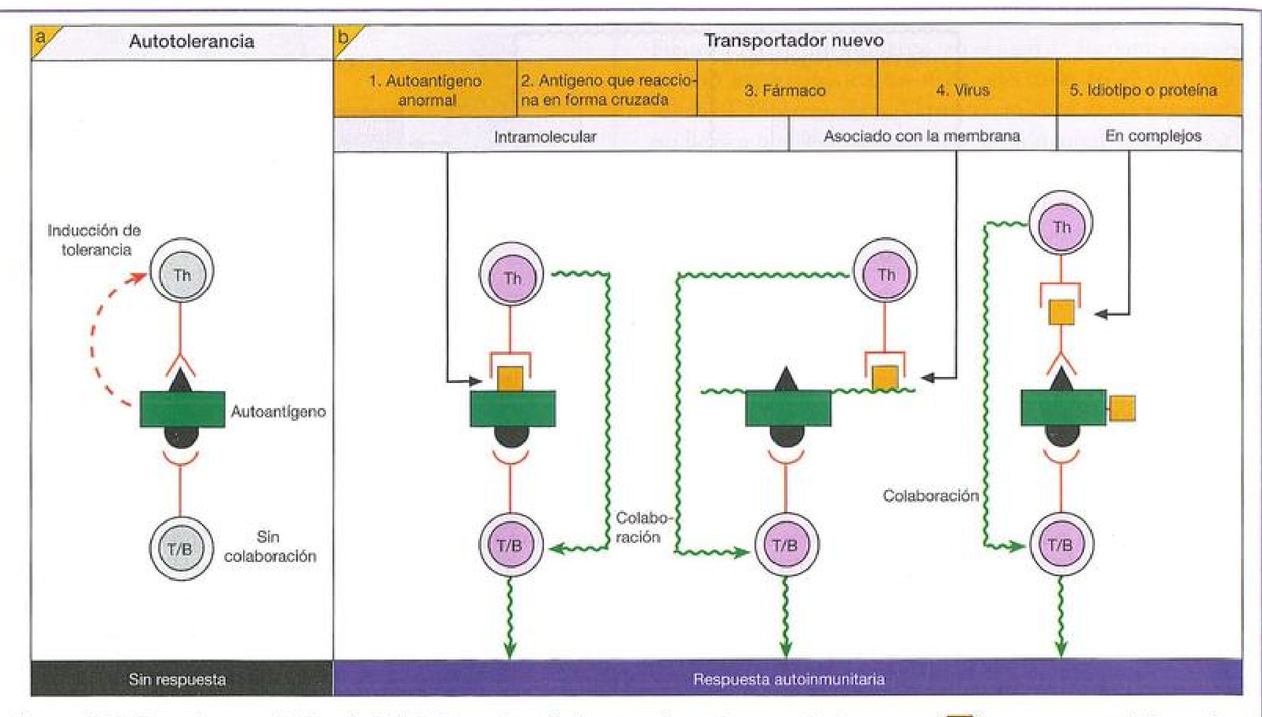


Figura 18.8. Cuando se evita la célula T *helper* a través de un epítopo transportador nuevo (■), se genera autoinmunidad.

Para simplificar, se omitió el procesamiento para la asociación con el CMH, que se presenta en detalle en la Figura 18.9. a) La célula T *helper* autorreactiva fundamental no es capaz de responder, sea por tolerancia o incapacidad para descubrir un epítopo críptico. b) Diversos mecanismos que aportan un epítopo transportador nuevo.

tica autoinmunitaria asociada con la administración de α-metildopa se podría atribuir a la modificación de la superficie de los eritrocitos de manera que proporcionen un transportador para la estimulación de las células B que reconocen al antígeno Rhesus (Rh). En condiciones normales, este es un antígeno "débil" y tendría menos probabilidades de inducir tolerancia en las células B que los antígenos "más fuertes" presentes sobre el eritrocito.

Mimetismo molecular de los epítopos para la célula T

Los epítopos para las células B presentes sobre el antígeno microbiano pueden reaccionar en forma cruzada, debido al mimetismo molecular, con un epítopo sobre un autoantígeno humano. Sin embargo, como el antígeno microbiano y el autoantígeno son sólo parcialmente similares, no habrá tolerancia de células T frente a secuencias localizadas sobre otras partes del antígeno microbiano. Por esto, habrá células T contra estas secuencias y pueden proporcionar colaboración a las células B que reconocen el epítopo que reacciona en forma cruzada (Figura 18.8b.2). Este mecanismo se explica en forma más detallada en la Figura 18.9a. Ya hemos mencionado que en la fiebre reumática los anticuerpos producidos contra *Streptococcus* también reaccionan con el corazón. Otro ejemplo es el de las proteínas de la envoltura de *Yersinia enterocolitica* de bajo peso molecular que comparten epítopos con el receptor de la hormona tirotropina (TSH).

El inconveniente del modelo de reacción cruzada con los epítopos para la célula B es que, una vez que el agente que reacciona en forma cruzada es eliminado del organismo, el epítopo para la célula T ya no está presente. Sin embargo, el agente infectante también puede simular un autoantígeno mediante la producción de un **epítopo para la célula T que reacciona en forma cruzada** sobre las células presentadoras de antígeno profesionales que pueden cebar a la célula T y estimular sus moléculas de adhesión. La célula T ahora tiene la **avidez** para unirse y estar persistentemente activada por el epítopo propio presentado en la célula del tejido específico siempre que esté asociado con la molécula adecuada del CMH (Figura 18.9b). Debe recordarse que las células T citotóxicas (Tc) transgénicas sólo son capaces de destruir a las células β del páncreas portadoras de un transgén viral si una infección viral verdadera actúa como **cebadora** (véase la Figura 11.9). También se deben tener en cuenta las células tumorales que sólo pudieron ser reconocidas por células T cebadas, pero no por células T en reposo (véase la Figura 17.14). En teoría, la célula T en reposo también podría ser cebada del antígeno de manera no específica por un **superantígeno** microbiano.

Si bien se señaló que la función predominante de los alelos del CMH como factores de riesgo de enfermedades autoinmunitarias se debía a su capacidad para presentar epítopos antigénicos fundamentales para las células T autorreactivas, también se cree que podrían obrar de una manera bastante diferente. Debe recordarse que, durante la ontogenia intratímica, las células T son seleccionadas positivamente mediante sus interacciones débiles con péptidos propios que forman complejos con el CMH. Como alrededor del **50% de los péptidos de clase II proviene del CMH**, las

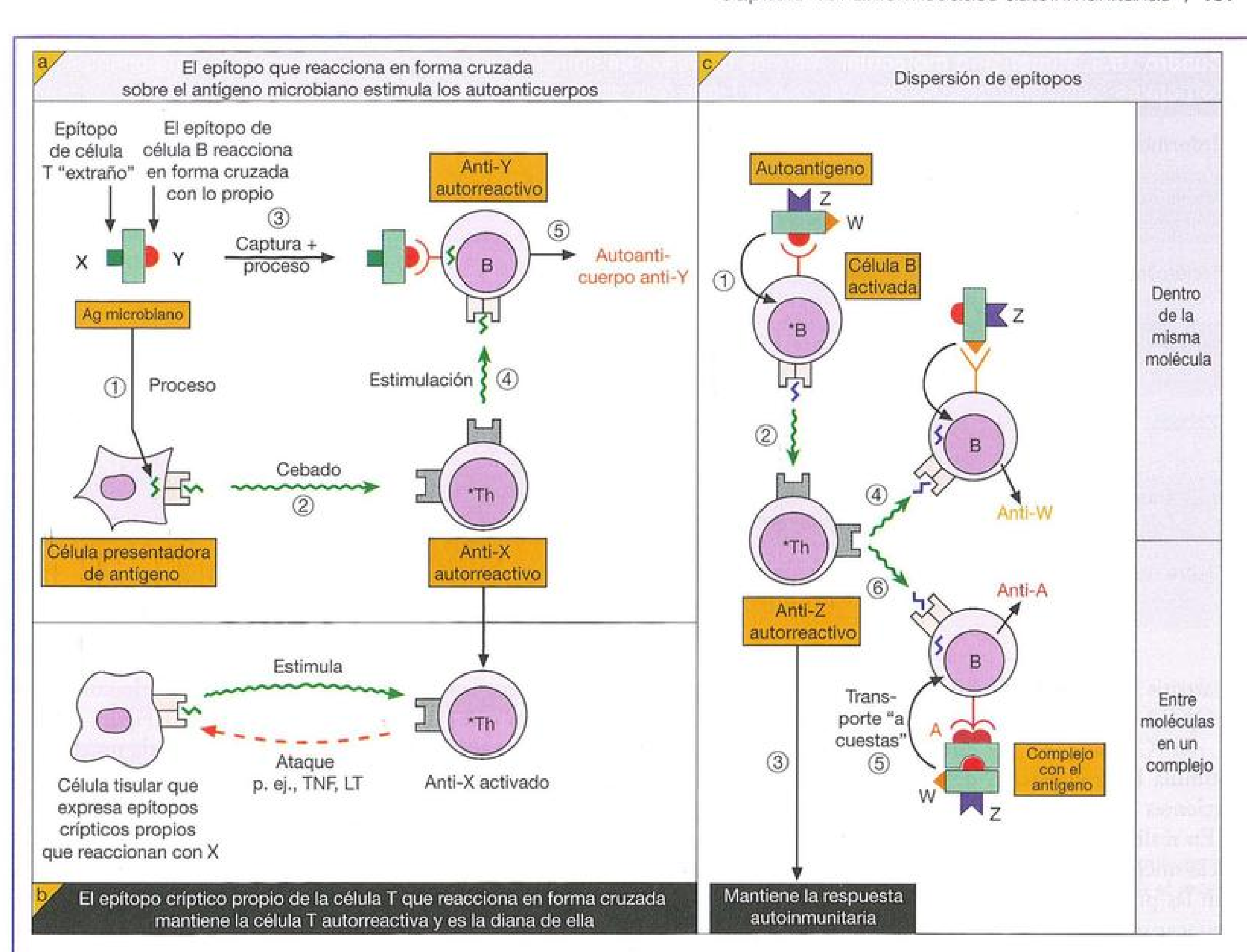


Figura 18.9. Mecanismos de inducción microbiana de autoinmunidad y diseminación de epítopos.

Esto es complejo, pero se recomienda su lectura porque estas ideas son fundamentales. Los más débiles necesitarán una bolsa de hielo y persistencia, pero resulta útil seguir los números.)
a) Un antígeno (Ag) microbiano que posee un epítopo Y que reacciona en forma cruzada con las moléculas propias y un epítopo X extraño para las células T es (1) procesado por una célula presentadora de antígeno; (2) activa a la célula T *helper*, la que (3) reconoce el X procesado tras la captura por una célula B anti-Y; y (4) estimula la célula B para segregar autoanticuerpos anti-Y. b) La célula T *helper* anti-X activada se diferencia de la célula en reposo en que puede reconocer y ser estimulada por un epítopo críptico para la célula T que reacciona en forma cruzada y se expresa en una célula tisular. Esta estimulación mantendrá la respuesta autoinmunitaria incluso después de la eliminación del microorganismo, debido a la persistencia del epítopo propio. El tejido que expresa el epítopo también se convertirá en diana del ataque inmunitario. También se debe advertir que una célula T *helper* cebada en forma inespecífica por un superantígeno policlonal activador podría cumplir la misma función de respuesta frente a un epítopo críptico. c) Si el autoantígeno es soluble o capaz de ser captado y procesado después de su captura por la célula B autorreactiva activada (1) (sea a partir de [a] o a través de una activación policlonal inespecífica), se puede presentar un epítopo nuevo sobre las moléculas de clase II de la célula B, que estimula a una célula T *helper* autorreactiva (anti-Z), (2) que mantiene la respuesta autoinmunitaria a través de la estimulación por el autoantígeno (3). Asimismo, se puede producir la diseminación del epítopo dentro de la misma molécula gracias a la colaboración de una célula B que captura al autoantígeno a través de un epítopo nuevo W (4) o contra otro componente de un complejo intermolecular, como histona nucleosómica-DNA o anti-DNA idiotipo positivo (Id+)- DNA que es transportado "a cuestas" al interior de la célula B (5). El antígeno procesado es presentado por la célula B a la T*helper* (6); en los casos citados, específicos para histona o Id, respectivamente. *Significa activación.

células T maduras que abandonan el timo deben haber sido seleccionadas con una fuerte tendencia al reconocimiento débil de los péptidos del CMH propio presentados por las moléculas de clase II. Por lo tanto, habrá un número grande de células T autorreactivas vulnerables a la estimulación por epítopos exógenos derivados de reacciones cruzadas que simulan ser esos péptidos del CMH. La secuencia QKRAA (la llamada secuencia "epítopo compartido") yace dentro de una región polimorfa de la cadena DRβ de DR1 y ciertos alelos DR4 y también está presente en las proteínas del choque térmico dnaJ de *E. coli*, *Lactobacillus lactis* y *Brucella avis*, así como la proteína gp110 del virus de Epstein-Barr. Esto provee la oportunidad para cebar las células T con especificidad autorreactiva para un péptido procesado que contenga QKRAA presentado por otra molécula HLA. Así, la secuencia QKRAAVDTY del alelo de susceptibilidad para

Cuadro 18.5. Mimetismo molecular. Algunos ejemplos de homologías entre microorganismos y componentes corporales como epítopos posibles de células T que reaccionan en forma cruzada.

Enfermedad	Molécula microbiana	Secuencia
Artritis reumatoide	Microorganismo: *Escherichia coli* Propia: HLA-DRB1*04:01	QKRAAVDTY QKRAAYDQY
Esclerosis múltiple	Microorganismo: virus de Epstein-Barr Propia: proteína básica de mielina	VYHFVKKHV VVHFFKNIV
Esclerosis múltiple	Microorganismo: *Chlamydia pneumoniae* Propia: proteína básica de mielina	YGCLLPRNPRTEDQN YGSLPQKSQRTQDEN
Diabetes tipo 1	Microorganismo: virus de hepatitis C Propia: ácido glutámico descarboxilasa 65	AAARRWAC AAARKAAC
Miastenia grave	Microorganismo: poliovirus Propia: receptor para acetilcolina	TKESRGTT IKESRGTK
Fiebre reumática	Microorganismo: *Streptococcus pyogenes* Propia: miosina cardíaca	LTDQNKNLTTEN LTSQRAKLQTEN

la artritis reumatoide HLA-DRB1*04:01 es muy semejante al QKRAAYDQY de la proteína de choque térmico dnaJ de *E. coli* (Cuadro 18.5), y este péptido presentado por DQ estimula la proliferación de las células T sinoviales en los pacientes con artritis reumatoide.

En realidad, se identificaron numerosas secuencias peptídicas microbianas que tienen grados variables de homología con las proteínas humanas (Cuadro 18.5), aunque se debe destacar que sólo representan indicios para un análisis más profundo. La mera existencia de homología no certifica que la infección por ese microorganismo producirá autoinmunidad, porque ello depende de varias contingencias, como la forma en que las células presentadoras de antígeno procesan las proteínas.

Epítopos transportados "a cuestas" por las células T y diseminación de los epítopos

Un componente de la membrana podría contribuir a la respuesta inmunitaria contra otro componente (reconocimiento asociativo). En el contexto de la autoinmunidad, podría surgir un nuevo determinante para la célula T *helper* a través de las modificaciones por fármacos mencionadas antes o de la inserción de antígenos virales en la membrana de una célula infectada (véase la Figura 18.8b.4). Que esto puede favorecer una reacción contra un componente celular preexistente fue demostrado con claridad mediante estudios en los que la infección de un tumor con el virus influenza desencadenaba resistencia en las células tumorales no infectadas. De manera comparable, la ayuda de la célula T puede ser provista por una molécula, como el DNA, que no puede constituir por sí un epítopo de la célula T, mediante la formación de complejos con un transportador dependiente de las células T, en este caso una histona, o un idiotipo anti-DNA contra el cual las células T fueron sensibilizadas. Para que este mecanismo actúe, el componente cooperador debe permanecer unido físicamente al fragmento que porta el epítopo para la célula B. Cuando el receptor de células B lo reconoce, el componente cooperador será "transportado a cuestas" por la célula B, procesado y presentado como epítopo para que las células T lo reconozcan (Figura 18.9c). Del mismo modo, la respuesta autoinmunitaria puede diseminarse a otros epítopos sobre la misma molécula.

Mecanismos para evadir el idiotipo

Los linfocitos con especificidad para los antígenos exógenos podrían estar conectados con los linfocitos autorreactivos a través de las conexiones de redes de idiotipos (Figura 18.10), sobre todo porque algunas enfermedades autoinmunitarias se caracterizan por idiotipos mayores que reaccionan en forma cruzada. Las células T *helper* con especificidad para el idiotipo presente sobre el receptor del linfocito pueden formar parte del proceso de estimulación de la célula que porta el idiotipo. Por esto, es concebible que un agente medioambiental, como un parásito o un virus, pueda estimular al anticuerpo portador de un idiotipo con reactividad cruzada que por casualidad es compartido con el receptor de una célula T o una célula B autorreactiva y, en consecuencia, pueda ser capaz de generar una respuesta autoinmunitaria.

Activación policlonal

A menudo, los microorganismos muestran propiedades adyuvantes porque contienen activadores policlonales de los linfocitos, como endotoxinas bacterianas. La variedad de autoanticuerpos detectados en casos de pacientes con mononucleosis infecciosa podría ser atribuida a la activación policlonal de las células B por el virus de Epstein-Barr (EB). No obstante, es difícil determinar la forma en que una activación policlonal panespecífica puede originar los patrones de autoanticuerpos característicos de los diferentes trastornos autoinmunitarios sin la participación de algún factor que dirija el antígeno. En secciones previas se mencionaron situaciones en las cuales las células B o las células T activadas en forma policlonal podrían contribuir al desarrollo de una respuesta autoinmunitaria sostenida (véase el epígrafe de la Figura 18.9b,c).

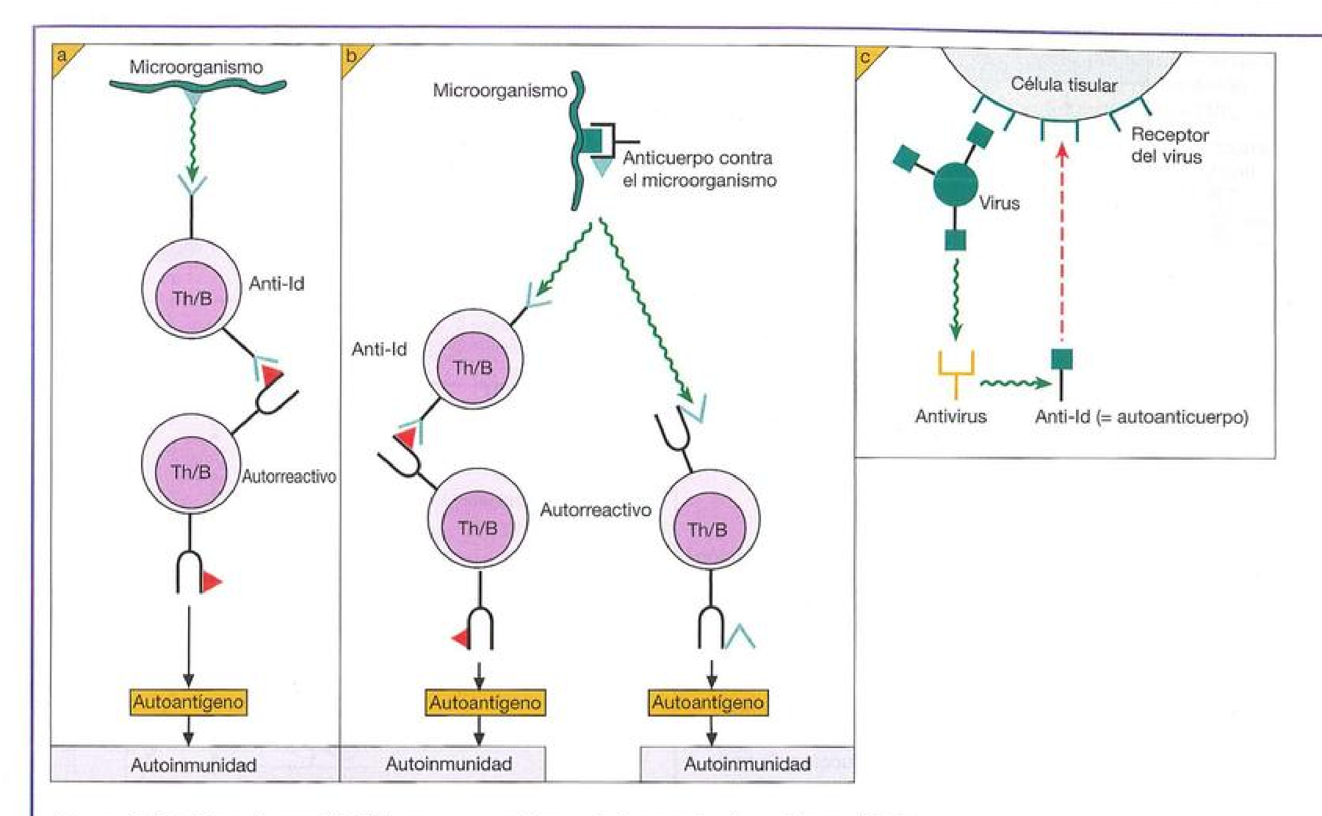


Figura 18.10. Mecanismos idiotípicos que conducen al desarrollo de autoinmunidad.

a) El antígeno microbiano reacciona en forma cruzada con el idiotipo (Id) del linfocito autorreactivo. b) Los anticuerpos contra el microorganismo comparten idiotipos con los linfocitos autorreactivos o son anti-Id. c) Los anticuerpos antivirus generan anti-Id, que representan un autoanticuerpo contra el receptor viral

Deficiencias reguladoras

Se debe señalar que estos mecanismos de evasión de las células T *helper* para inducir autoinmunidad no aseguran por sí solos la continuación de la respuesta, dado que se demostró que los animales normales son capaces de atenuar la producción de autoanticuerpos mediante interacciones con las células T CD4 reguladoras como, por ejemplo, en el caso de los autoanticuerpos contra los eritrocitos inducidos en ratones después de la inyección de eritrocitos de rata (Figura 18.11). Cuando la actividad de las células T reguladoras es alterada por la administración de dosis bajas de ciclofosfamida, o se emplean cepas como SJL que presentan reguladores con envejecimiento prematuro, la autoinmunidad inducida se prolonga y es más intensa. Muchos trabajos se centraron en las células T reguladoras CD4$^+$ CD25$^+$ Foxp3$^+$ (véase la Figura 10.12), que suprimen muchos fenómenos autoinmunitarios. Sin embargo, los mecanismos de control celular nunca son tan simples y es importante apreciar que las células T CD25$^-$ son eficaces en el control de la enfermedad mediada por células T en ciertas circunstancias. Resulta interesante señalar que el TGFβ puede convertir a estas células CD4$^+$, CD25$^-$, Foxp3$^-$ en el fenotipo Tr1 CD4$^+$, CD25$^+$, Foxp3$^+$ (véase la Figura 10.12), característico de las células reguladoras de la mucosa que median la tolerancia oral; estas células producen IL-10 cuando son activadas y promueven la diferenciación de las células T que secretan TGFβ (Th3) y desvían las respuestas hacia el polo del tipo Th2. Otro participante, la célula NKT, que es deficiente en los ratones NOD, puede prevenir la aparición de diabetes si es transferido de donantes F1(BALB/c × NOD). Se informó que los pacientes con diversas enfermedades autoinmunitarias presentan cantidades de células o función de éstas reducida (Figura 18.12). Resulta fascinante que el deterioro de la función de las células T reguladoras observado en los pacientes con artritis reumatoide se normaliza después del tratamiento exitoso con anticuerpos monoclonales anti-TNF (Figura 18.13).

¿Las alteraciones en los mecanismos apoptósicos contribuyen también a estos defectos reguladores? Las células T y las células B de los ratones NOD son resistentes a la apoptosis, así como los linfocitos de la cepa de ratones MRL/*lpr* para el lupus con una mutación en el gen *fas*. Esta mutación produce la linfoproliferación característica y tal vez la incapacidad de limitar la expansión de clones de células T y B autorreactivas por apoptosis. El modelo de lupus *gld* complementa esta situación con mutaciones en el *ligando fas*.

La atención también se centró en otra faceta de los procesos de regulación inmunitaria, es decir, en el receptor para la IgG reguladora sobre las células B que tiene como función el control por retroalimentación a través de la señalización de un complejo inmunitario superficial. Es evidente que la disfunción en el receptor de la célula B FcγRIIB en los ratones con tendencia a desarrollar lupus se puede corregir mediante la transducción retroviral de un gen normal (Figura 18.14).

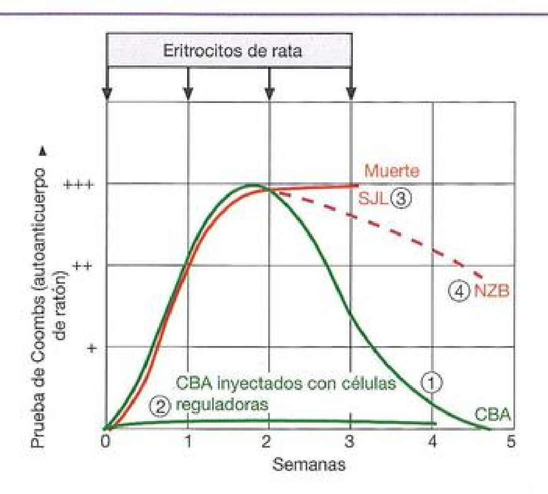


Figura 18.11. Regulación de la autorreactividad.

Cuando los ratones de la cepa CBA (1) reciben una inyección de eritrocitos de rata, se producen autoanticuerpos por este antígeno que reacciona en forma cruzada (véase la Figura 18.9a) que recubren a los eritrocitos del huésped y son detectados mediante la prueba de antiglobulina de Coombs. A pesar de la administración de inyecciones repetidas de eritrocitos de rata, la respuesta de autoanticuerpos se desactiva por la expansión de células reguladoras CD4 específicas para los eritrocitos de ratón que no afectan la producción de anticuerpos contra los determinantes de los eritrocitos heterólogos. Cuando se inyectan estas células reguladoras en ratones CBA no sensibilizados con anterioridad (2), los eritrocitos de rata no pueden inducir autoanticuerpos. La cepa SJL (3), en que la actividad supresora disminuye en forma rápida con la edad, es incapaz de regular la respuesta autoinmunitaria y experimenta una enfermedad particularmente grave. (4) La respuesta también es prolongada en la cepa NZB autoinmunitaria. (Basada en datos de Cooke A. y Hutchings P. [1984] *Immunology* **51**, 489-492.)

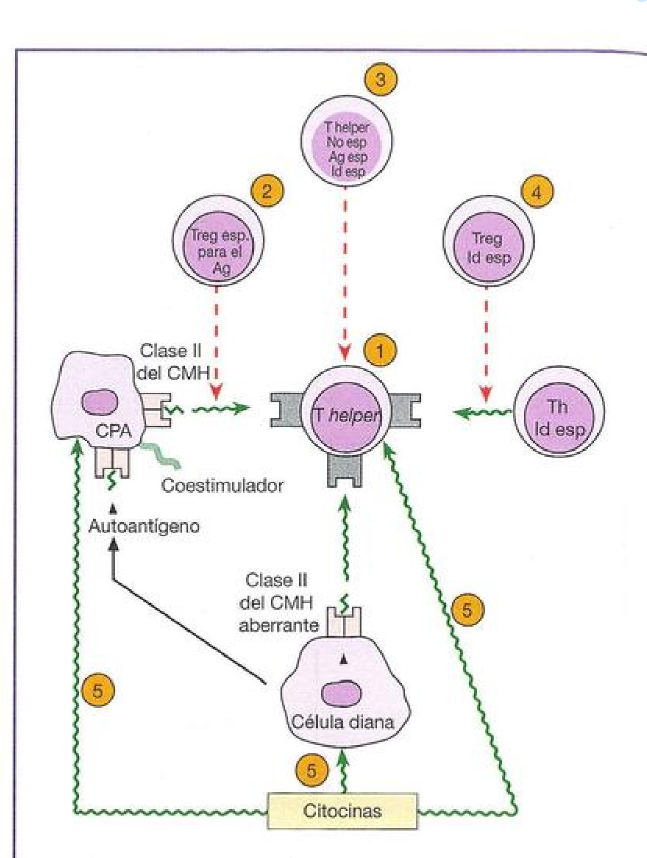


Figura 18.12. La evasión de los mecanismos reguladores conduce a la activación de las células T *helper* autorreactivas.

Esto se produce a través de defectos en la (1) capacidad para inducir tolerancia o responder o inducir células T reguladoras (Treg) o expresión de (2) células T reguladoras específicas para el antígeno (Ag-esp), (3) hsp y otras inespecíficas (no esp) o (4) específicas para el idiotipo (Id-esp) o (5) a través de un desequilibrio en la red de citocinas que produce una desrepresión de los genes de clase II con expresión celular inapropiada de los antígenos de clase II y presentación del antígeno sobre la célula diana, estimulación de la célula presentadora de antígeno (CPA) y posible activación de células T *helper* anérgicas.

En secciones anteriores, la atención se dirigió a las propiedades distintivas de la población B-1 respecto de su tendencia a sintetizar autoanticuerpos IgM y su posible relación íntima con el establecimiento de la red de idiotipos reguladores, y se debe considerar con seriedad la hipótesis de que la actividad no regulada de estas células podría ser responsable de ciertos trastornos autoinmunitarios. En los seres humanos, una proporción elevada de las células B-1 sintetiza factores reumatoideos IgM (anti-Fcγ) y anti-DNA mediante el empleo de genes de la línea germinal.

Expresión aberrante de moléculas de clase II del CMH

Normalmente, sólo las células presentadoras de antígeno profesionales como las células dendríticas expresan moléculas de clase II del CMH. Por consiguiente, la mayoría de los autoantígenos específicos de órganos aparece sobre la superficie de las células del órgano diana en el contexto de moléculas de clase I del CMH (presentes en todas las células nucleadas), pero no de clase II. Debido a esto, los autoantígenos no pueden ser presentados a las células T *helper* y, en consecuencia, son silenciosos desde el punto de vista inmunitario. Pujol-Borrell, Bottazzo y cols. consideraron que si los genes de las moléculas de clase II se desreprimieran de alguna manera y se sintetizaran ahora moléculas de clase II, éstas dotarían a estas células de la capacidad de presentar péptidos a las células T CD4+ (Figura 18.12). En realidad, estos autores demostraron que es posible inducir a las células tiroideas humanas obtenidas por cultivo de tejidos a expresar moléculas del HLA-DR (de clase II) sobre la superficie después de su estimulación con interferón γ (IFNγ). La expresión inapropiada de moléculas de clase II ha sido informada en los conductillos biliares de pacientes con cirrosis biliar primaria y en las células endoteliales y algunas células β del páncreas en diabetes tipo 1.

Todavía no se definió si la expresión aberrante de moléculas de clase II sobre estas células como resultado de su activación por algún factor, como IFN inducido viralmente, es responsable de la *iniciación* del proceso autoinmunitario tras el efecto de cebado de células T *helper* autorreactivas o si una reacción que *ya activó* a las células T induce moléculas de clase II a través de la liberación de IFNγ y convierte a la célula en

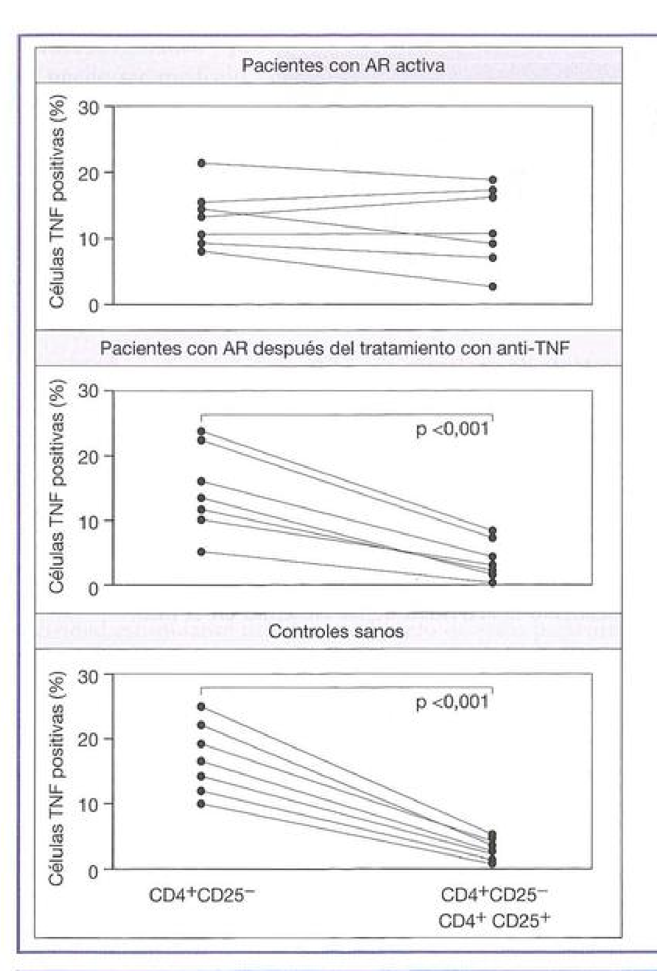


Figura 18.13. Reversión del compromiso de la función de la célula T reguladora en pacientes con artritis reumatoide (AR) mediante el tratamiento con anticuerpos anti-TNF.

Las células CD4+CD25− aisladas de la sangre periférica fueron estimuladas con una mezcla de anticuerpos anti-CD23 y anti-CD28 aislados o después de volver a agregar las células T reguladoras CD4+ CD25+. La activación de las células T se evaluó mediante tinción para TNF intracelular. Las líneas unen los valores de pacientes individuales después de volver a agregar las células T reguladoras CD4+ CD25+. En la AR las células T reguladoras fueron disfuncionales, pero pudieron suprimir la activación de la población CD25− después del tratamiento exitoso con anti-TNF. (Datos de Ehrenstein M.R. y col. [2004] *Journal of Experimental Medicine* **200**, 277-285.)

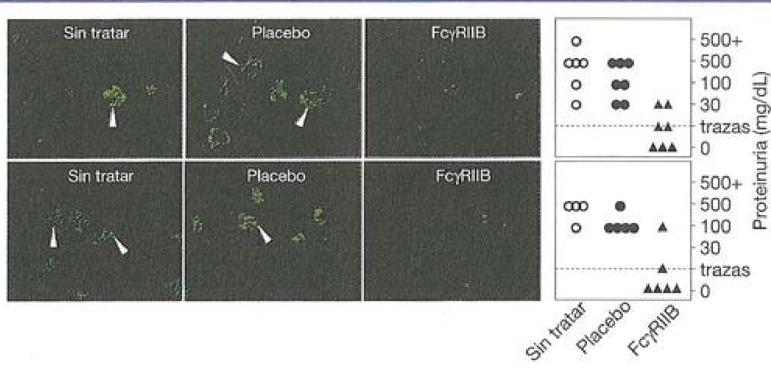


Figura 18.14. Transducción retroviral del receptor regulador de IgG sobre las células B (FcγRIIB) en ratones propensos a desarrollar lupus en forma espontánea.

Seis meses después de recibir la transferencia de FcγRIIB de medula ósea transducida en forma retroviral, se redujo el depósito de inmunocomplejos y la función renal mejoró en ratones NZM2410 (fila superior) y BXSB (fila inferior) propensos al lupus. Se examinaron cortes de riñón teñidos con inmunofluorescencia directa en busca de complejos IgG (×40). Las puntas de flecha indican la presencia de complejos subendoteliales compatibles con lupus activo. (Reseñado con autorización de McGaha T.L., Sorrentino B. y Ravetch J.V. [2005] *Science* **307**, 590-593, Copyright 2005 AAAS.)

un objetivo más atractivo para el daño tisular posterior. Sin embargo, la transfección de ratones con los genes *H-2A* de clase II unidos al promotor de la insulina llevó a la expresión de moléculas de clase II sobre las células β de los islotes del páncreas, pero *no* a la inducción de autoinmunidad. La ausencia de moléculas coestimuladoras B7 parece ser responsable de que estas células β positivas para las moléculas de clase II sean incapaces de activar a las células T vírgenes, tarea que podría quedar a cargo de las células presentadoras de antígeno profesionales.

Los desequilibrios en las citocinas podrían inducir autoinmunidad

En cambio, en las mismas circunstancias, la transfección con el gen *IFNγ* en el promotor de la insulina causó una

LES   Controles   Tratados con PBS   Tratados con IFNγ   Tratados con IFNα/β

Figura 18.15. Patrón característico del IFNα en un subgrupo importante de pacientes con LES.

Patrones de expresión de los genes inducidos por IFN en la sangre de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) y en los controles (rojo = expresión elevada). La barra negra indica 22 de los genes que experimentaron sobreexpresión de IFN que delinea el patrón característico. (Reproducido de Baechler E.C., Gregersen P.K. y Behrens T.W. [2004] *Current Opinion in Immunology* **16**, 803, con autorización de los autores y los editores.)

reacción inflamatoria local en el páncreas, con expresión aberrante de moléculas de clase II *y* diabetes; esto puede haber sido una consecuencia de la autoinmunidad, dado que un páncreas normal injertado en el mismo animal experimentó un destino semejante. Esto implica que la producción no regulada de citocinas que causa una reacción inflamatoria local puede iniciar la autoinmunidad, tal vez al aumentar la presentación del antígeno del islote mediante el reclutamiento y la activación de células dendríticas, el incremento de la concentración de los autoantígenos intracelulares procesados a su alcance y el aumento de su avidez por las células T vírgenes mediante la sobreexpresión de las moléculas de adhesión; es probable que las células anérgicas puedan adquirir capacidad para responder al antígeno (Figura 18.12). Una vez que han sido sensibilizadas (cebadas), las células T interactúan con las células β del islote que expresan una cantidad mayor de moléculas de clase II y de adhesión para las células T sobre su superficie.

Todo esto parece muy simple, pero aunque otras citocinas proinflamatorias como IL-12, TNF e IFNγ pueden inducir una enfermedad autoinmunitaria específica de órgano en un momento temprano de la evolución a través del establecimiento de respuestas Th1 patógenas, la expresión tardía de las mismas citocinas puede dirigir la diferenciación terminal y la muerte de las células T autorreactivas. Esto implica que, en realidad, algunos modelos espontáneos de enfermedad autoinmunitaria se pueden corregir mediante la inyección de citocinas: la IL-1 revierte la diabetes en ratones NOD, el factor de necrosis tumoral (TNF) previene la aparición de los síntomas del LES en los híbridos NZB × W y el factor transformador de crecimiento β (TGFβ protege contra la artritis inducida por colágeno y la encefalomielitis autoinmunitaria experimental (EAE) recidivante. Los efectos pleiotrópicos de las citocinas sobre los diferentes tipos celulares implicados en los diversos estadios de estas enfermedades y las interacciones positivas y negativas entre los constituyentes de esa red agregan cierta incertidumbre al análisis y la predicción de estos fenómenos complejos. En relación con los trastornos humanos, el análisis de la expresión de diversos genes regulados positivamente por el interferón α (Figura 18.15) y de los niveles elevados de citocina que se correlacionan con el desarrollo de enfermedad más grave esclareció la actividad de las citocinas en el LES.

Efectos patogénicos de los autoanticuerpos humorales

A continuación, se analizarán las evidencias que contribuyen a esclarecer los mecanismos por medio de los cuales la autoinmunidad cumple un **papel patógeno primario** en la producción de lesiones tisulares dentro del grupo de enfermedades clasificadas como "autoinmunitarias". En primer término, se describirán los autoanticuerpos efectores.



Células sanguíneas

Los anticuerpos contra los eritrocitos cumplen una función predominante en la destrucción de éstos en la **anemia hemolítica autoinmunitaria.** Los eritrocitos normales recubiertos por autoanticuerpos eluidos provenientes de eritrocitos con prueba de Coombs positiva (véase la Figura 15.17) tienen una semivida más corta después de su reinyección en el individuo normal, en esencia como resultado de su unión a los receptores Fcγ sobre las células fagocíticas del bazo.

La linfopenia que aparece en pacientes con lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide también podría ser una consecuencia directa de la acción de los anticuerpos, ya que en estos casos se comunicó la identificación de anticuerpos no aglutinantes que recubren los leucocitos.

Los anticuerpos contra las plaquetas parecen ser responsables de la **púrpura trombocitopénica idiopática.** Cuando se administra IgG del suero de un paciente a un individuo normal, se produce una disminución del recuento plaquetario y el componente activo puede ser extraído junto con las plaquetas. Se puede detectar trombocitopenia neonatal transitoria en lactantes nacidos de madres con púrpura trombocitopénica idiopática debido al pasaje transplacentario de anticuerpos IgG hacia el niño.

El **síndrome antifosfolipídico** primario se caracteriza por fenómenos tromboembólicos venosos y arteriales recurrentes, pérdida fetal reiterada, trombocitopenia y anticuerpos anticardiolipina. La transferencia pasiva de estos anticuerpos en los ratones genera un efecto bastante devastador,

reduce la fertilidad y produce muerte fetal reiterada. El efecto puede ser mediado por la reacción de autoanticuerpos con un complejo de cardiolipina y β_2-glucoproteína-1, que impide la activación de la cascada de la coagulación. El trofoblasto placentario es una diana primaria de estos anticuerpos, ya que el citotrofoblasto velloso es uno de los pocos tipos celulares que presenta fosfatildilserina en su superficie externa durante su desarrollo.

Receptores de superficie

Tiroides

En determinadas circunstancias, los anticuerpos contra la superficie de una célula podrían causar su estimulación en lugar de su destrucción (véase "Hipersensibilidad estimuladora", Capítulo 15). Por cierto, este es el caso de la **enfermedad de Graves** (enfermedad de Basedow), en la que la relación directa con la autoinmunidad se determinó por el descubrimiento realizado por Adams y Purves acerca de la actividad estimulante tiroidea en el suero de estos pacientes (Avances y descubrimientos 18.1); más tarde se demostró que era causada por la presencia de anticuerpos contra los receptores para TSH (TSHR), que imitan el efecto de la TSH (Figura 18.16a). Ambos operan a través del sistema de la adenilatociclasa y producen modificaciones similares en la morfología ultraestructural de la célula tiroidea. Con la estimulación constante por el autoanticuerpo, se produce el aumento de tamaño de la glándula tiroides (denominado **bocio**), que conduce al **hipertiroidismo** (una glándula tiroides hiperactiva). Este último a menudo se acompaña de exoftalmía (en la que los ojos protruyen de la órbita) debida tal vez a la inflamación causada, porque el TSHR también está expresado en los fibroblastos de la órbita. Uno de los "experimentos de transferencia pasiva" de la naturaleza fue el que permitió vincular a los anticuerpos contra TSHR en forma más directa con la patogenia de la enfermedad de Graves. Cuando los anticuerpos estimulantes de la tiroides presentes en una mujer embarazada atraviesan la placenta, causan la producción de hipertiroidismo neonatal (tirotoxicosis neonatal) (Figura 18.17). Esta es, en esencia, una forma transitoria de la enfermedad de Graves en la descendencia, salvo que en este caso está causada por los anticuerpos maternos en lugar de producirse por los autoanticuerpos y, por lo tanto, en el recién nacido no es una enfermedad "autoinmunitaria". La IgG tienen una semivida de alrededor de 3 semanas y, en consecuencia, la enfermedad neonatal se resuelve tras algunas semanas cuando se cataboliza la IgG materna. Asimismo, recuérdese que el cambio de clase que sucedió en la madre requirió la colaboración de las células T y, en consecuencia, aunque en este caso parece bastante

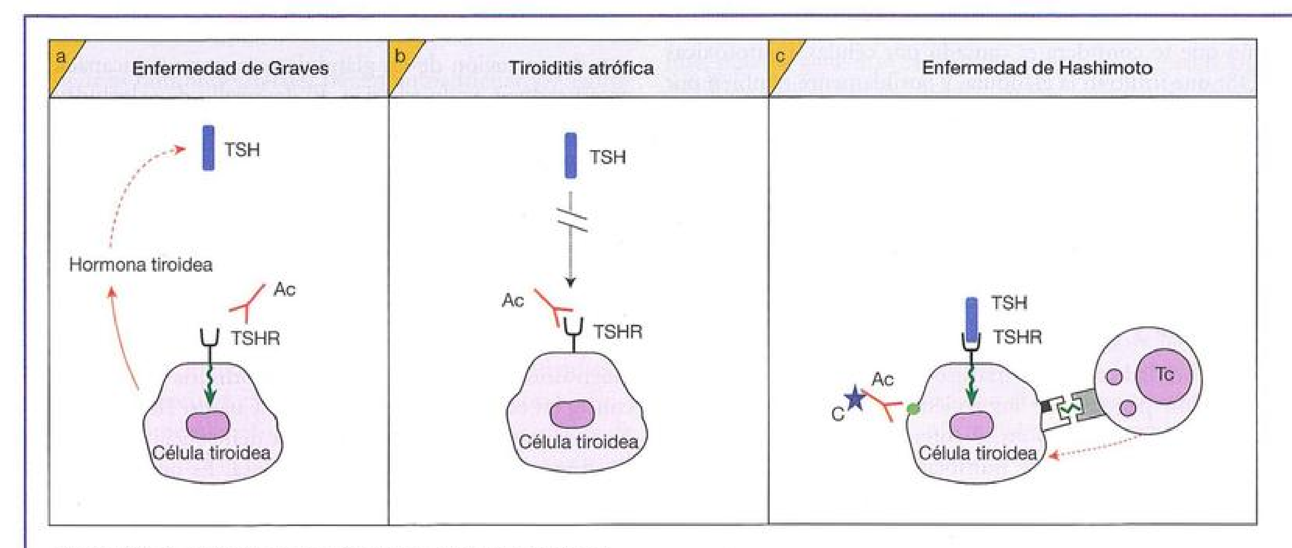
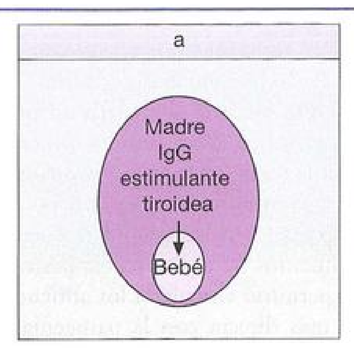


Figura 18.16. Enfermedades tiroideas autoinmunitarias.

Se ilustran los tres tipos principales de enfermedad autoinmunitaria. a) En la enfermedad de Graves, los autoanticuerpos se unen al receptor de la tirotropina (TSHR) sobre las células epiteliales tiroideas. Estos anticuerpos actúan como agonistas y simulan el efecto de la TSH. Los plasmocitos producen de manera continua autoanticuerpos y, por consiguiente, su producción no está afectada directamente por las concentraciones de la hormona tiroidea, a diferencia de las concentraciones de TSH, que están sujetas al circuito de retroalimentación negativa y, por esto, disminuyen cuando se producen concentraciones adecuadas de la hormona tiroidea. La activación constante de las células tiroideas por el autoanticuerpo estimulador da por resultado hipertiroidismo. b) En la tiroiditis atrófica (mixedema primario), también se producen autoanticuerpos contra el receptor para TSH pero se unen a epítopos diferentes de los hallados en la enfermedad de Graves y actúan como antagonistas en lugar de como agonistas. Su capacidad para bloquear el acceso de la TSH al TSHR produce hipotiroidismo. c) Los autoanticuerpos en la enfermedad de Hashimoto están dirigidos sobre todo contra la peroxidasa tiroidea y la tiroglobulina. Las células tiroideas pueden ser afectadas por las células T citotóxicas que reconocen péptidos provenientes de estos autoantígenos, por anticuerpos fijadores del complemento dirigidos contra el autoantígeno intacto o por ambos mecanismos. Aunque la TSH puede unirse al receptor TSH y estimular las células tiroideas, la destrucción de la glándula por el ataque autoinmunitario causa hipotiroidismo. Lo más probable es que estas afecciones formen un espectro de enfermedades tiroideas autoinmunitarias en la que algunos pacientes con enfermedad de Hashimoto posean también anti-TSHR estimuladores o inhibidores.



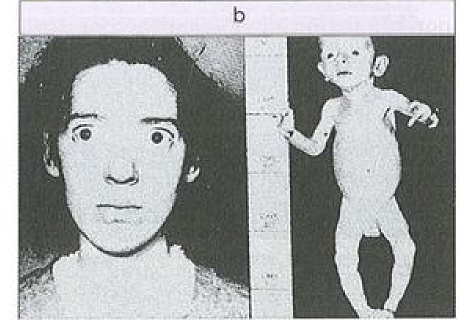


Figura 18.17. Tirotoxicosis neonatal.

a) Los autoanticuerpos que estimulan a la tiroides a través de los receptores de TSH son del tipo IgG y atraviesan la placenta. b) En consecuencia, la madre con tirotoxicosis da a luz un recién nacido (RN) con hiperactividad tiroidea, que se resuelve en forma espontánea cuando se cataboliza la IgG de la madre. (Fotografías cortesía de A. MacGregor.)

claro que el anticuerpo es el efector tanto en la madre como en el niño, también puede haber un defecto primario en la respuesta inmunitaria.

Por el contrario, los sueros de pacientes con **tiroiditis atrófica** (mixedema primario) contienen anticuerpos capaces de bloquear la estimulación por TSH (Figura 18.16b), que da por resultado **hipotiroidismo** (una glándula tiroides con actividad por debajo de lo normal). En la **enfermedad de Hashimoto** se produce una tiroiditis destructiva, con daño que se considera es causado por células T citotóxicas $CD8^+$ que infiltran la glándula, y posiblemente también por autoanticuerpos IgG que fijan el complemento (Figura 18.16c), que de nuevo conducen al hipotiroidismo. No se comprende por completo la relación exacta entre tiroiditis atrófica y enfermedad de Hashimoto, si bien se considera que ambas entidades representan dos extremos de un espectro de tiroiditis autoinmunitaria.

Músculos y nervios

La debilidad muscular transitoria que se observa en una proporción pequeña de los recién nacidos de madres con **miastenia grave**, como en la enfermedad de Graves, sería compatible con el pasaje transplacentario de una IgG. En este caso, el anticuerpo sería capaz de inhibir la transmisión neuromuscular. El hallazgo de anticuerpos contra los receptores musculares de acetilcolina (AChR) en pacientes con miastenia y la disminución de estos receptores dentro de las placas terminales motoras avalan con firmeza esa teoría. Además, se pueden inducir síntomas de miastenia en animales mediante la inyección de anticuerpos monoclonales contra AChR o por la inmunización activa con receptores purificados. No obstante, la mayoría de los recién nacidos de madres con miastenia no desarrolla enfermedad muscular y, como parece ser el caso en otras enfermedades neonatales transitorias causadas por anticuerpos maternos, esto se relaciona en gran medida con las concentraciones de autoanticuerpos presentes en la madre.

Las alteraciones neuromusculares también pueden ser inducidas en ratones por medio de la inyección de suero de pacientes con síndrome de **Lambert-Eaton** que contiene anticuerpos contra los canales de calcio presinápticos. Se identificaron autoanticuerpos contra los canales de sodio que reaccionan en forma cruzada con los bacilos *Campylobacter* en el **síndrome de Guillain-Barré**, una polineuritis periférica de resolución espontánea.

Estómago

La lesión histopatológica subyacente en la **anemia perniciosa** es una gastritis atrófica que se caracteriza por invasión crónica de células inflamatorias mononucleares asociada con degeneración de las glándulas secretoras e incapacidad para producir ácido gástrico. El desarrollo de aclorhidria se acelera casi con certeza debido a la acción inhibidora de los anticuerpos contra la bomba de protones gástrica, una ATPasa dependiente de H^+/K^+.

Otros tejidos

Intestino

Algunos pacientes con **gastritis atrófica autoinmunitaria** diagnosticada por el hallazgo de aclorhidria y anticuerpos contra las células parietales (véase el Cuadro 18.2) evolucionan año tras año sin desarrollar la deficiencia de vitamina B_{12} que precipita la **anemia perniciosa**. Es probable que la destrucción autoinmunitaria permanezca en equilibrio con la regeneración de las células de la mucosa, lo cual podría explicar el hecho de que la administración de dosis elevadas de corticoides pueda restablecer la función gástrica en algunos pacientes con anemia perniciosa. Sin embargo, el equilibrio se alteraría cuando el paciente comienza a producir anticuerpos contra el factor intrínseco en la luz del tubo digestivo; estos anticuerpos neutralizarían la pequeña cantidad de factor intrínseco disponible y se generaría un balance negativo de la vitamina B_{12}. Los síntomas de la deficiencia de vitamina B_{12}, la anemia perniciosa, y a veces la degeneración subaguda de la médula espinal aparecerían bastante tiempo después, cuando se agotan los depósitos hepáticos.

La tolerancia normalmente adquirida a las proteínas de la dieta parece estar alterada en los pacientes con **enfermedad celíaca**, en los cuales se puede demostrar sensibilidad de la célula T al gluten de trigo en el intestino delgado. Como el

gluten se puede unir con firmeza a la proteína de la matriz extracelular, el endomisio, podría aventurarse la hipótesis de que la captación del complejo formado por la IgA con las células B específico para el endomisio podría transportar "a cuestas" (*piggy back*) el gluten al interior de la célula B para su procesamiento y presentación sobre moléculas de clase II del CMH a las células T *helper* específicas para el gluten (véase la Figura 18.9). La estimulación de la célula B se seguiría de la secreción de anticuerpos IgA contra el endomisio que sólo se observan en los pacientes con enfermedad celíaca. A pesar de la presencia de estos autoanticuerpos, la activación por la dieta explica que esta enfermedad sea considerada como hipersensibilidad de tipo IV en lugar de enfermedad autoinmunitaria *bone fide.*

Piel

La patogenia de los anticuerpos en el **pénfigo vulgar** es favorecida por la correlación entre la gravedad de la enfermedad y el título de autoanticuerpos contra la desmogleína 3 (un miembro de la familia de las cadherinas de las moléculas de adhesión dependientes del Ca^{2+}) presentes en las uniones intercelulares de las células epiteliales cilíndricas. De la misma manera, los anticuerpos contra la desmogleína podrían mediar la formación de ampollas en la epidermis de los pacientes con **pénfigo foliáceo**.

Espermatozoides

Algunos **hombres estériles** tienen autoanticuerpos aglutinantes que estimulan la agregación de los espermatozoides e interfieren sobre su capacidad para penetrar en el moco cervical.

Membrana basal glomerular

En relación con la enfermedad inmunitaria renal, los modelos experimentales precedieron al hallazgo de lesiones similares en los seres humanos. La inyección de preparados heterólogos de membrana basal glomerular en adyuvante completo de Freund capaces de reaccionar en forma cruzada causa glomerulonefritis en ovinos y otros animales de experimentación. Los anticuerpos contra la membrana basal glomerular se pueden evidenciar mediante tinción inmunofluorescente con anti-IgG en biopsias de animales nefríticos. El riñón absorbe casi todos o todos esos anticuerpos *in vivo*, pero estos aparecen en el suero después de la nefrectomía y pueden transferir pasivamente la enfermedad a otro animal de la misma especie.

Una situación análoga se produce en los seres humanos en ciertos casos de glomerulonefritis, en particular cuando se asocia con hemorragia pulmonar (**síndrome de Goodpasture**). La biopsia renal muestra el depósito *lineal* de IgG y C3 a lo largo de la membrana basal de los capilares glomerulares (Figura 15.18a). Lerner y cols. aislaron anticuerpos contra la membrana basal glomerular de un riñón enfermo y lo inyectaron en un mono ardilla. Estos anticuerpos se fijaron con rapidez a la membrana basal del glomérulo del animal receptor, al que le produjeron una nefritis que lo llevó a la muerte. La conclusión es que la lesión en el ser humano es el resultado directo del ataque a la membrana basal glomerular por esos anticuerpos fijadores de complemento. Los cambios pulmonares del síndrome de Goodpasture se atribuyen a reacciones cruzadas con algunos de los anticuerpos contra la membrana basal glomerular.

Corazón

El lupus eritematoso neonatal es la causa más frecuente de **bloqueo cardíaco completo congénito**. En casi todos los casos se detectan títulos maternos elevados de anticuerpos anti-La/SS-B o anti-Ro/SS-A. El corazón de la madre no es afectado. La observación clave fue que el anticuerpo anti-Ro se unía al tejido cardíaco neonatal y no al del adulto, y alteraba el potencial de acción transmembrana por inhibición de la repolarización. El anticuerpo IgG anti-Ro llega a la circulación fetal después de atravesar la placenta, pero aunque el corazón materno y el fetal quedan expuestos al autoanticuerpo, sólo el segundo es afectado. El anticuerpo anti-La también se fija a los corazones fetales afectados y reacciona con la laminina en la membrana basal.

Efectos patogénicos de los complejos con autoantígenos

Lupus eritematoso sistémico (LES)

Cuando se forman autoanticuerpos contra los componentes solubles que toman contacto con ellos en forma continua, pueden generarse complejos que dan lugar a reacciones de hipersensibilidad de tipo III, en especial cuando defectos en los componentes tempranos del complemento clásico impiden su depuración efectiva. De tal modo, aunque la deficiencia homocigota de complemento es una causa poco frecuente de LES, que constituye el trastorno arquetípico por inmunocomplejos, representa el genotipo de susceptibilidad para el desarrollo de enfermedad más poderoso identificado hasta la fecha; más del 80% los casos de deficiencia homocigota de C1q y C4 presenta LES. Hasta la mitad de los pacientes posee autoanticuerpos contra la porción colagenosa de C1q, pero en realidad el lupus se caracteriza por una gran variedad de autoantígenos diferentes (véase el Cuadro 18.2), algunos de ellos constituyentes del nucleosoma (véase la Figura 18.1b), y el más patognomónico es el **DNA de cadena doble** (dsDNA). El anticuerpo anti-dsDNA abunda en crioglobulinas y ácidos eluidos de tejido renal de pacientes con nefritis lúpica, donde se lo puede identificar, en complejos que contienen complemento, mediante tinción inmunofluorescente de biopsias renales de pacientes con indicios de disfunción renal. El patrón de tinción con anticuerpo anti-IgG o anti-C3 fluorescente es moteado o "grumoso", como alguna vez se describió (véase la Figura 15.18b), lo cual contrasta de modo notorio con el patrón lineal causado por los anticuerpos contra la membrana basal glomerular en el síndrome de Goodpasture (Figura 15.18a). El tamaño de los complejos aumenta hasta constituir grandes agregados visibles con el microscopio electrónico como cúmulos amorfos a ambos lados de la membrana basal glomerular (Figura 18.18). Durante la fase activa de la enfermedad, las concentraciones séricas del complemento disminuyen cuando los componentes son afectados por la

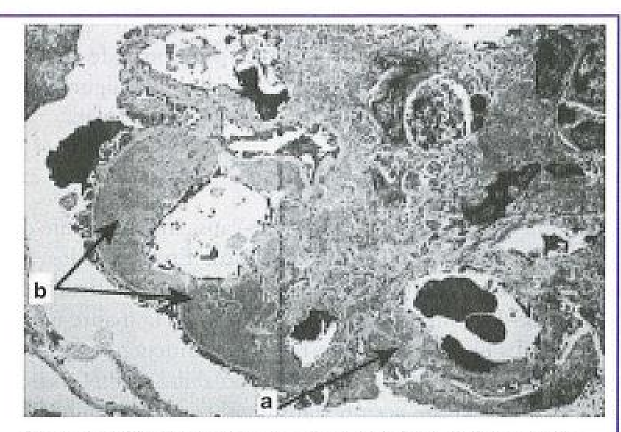


Figura 18.18. Biopsia renal de un paciente afectado de lupus eritematoso sistémico con glomerulonefritis por inmunocomplejos grave y proteinuria.

La microfotografía electrónica muestra el engrosamiento irregular de las paredes de los capilares glomerulares por la presencia de complejos subepiteliales a) y subendoteliales b). La región del mesangio muestra abundantes complejos (probablemente fagocitados). (Cortesía de A. Leatham.)

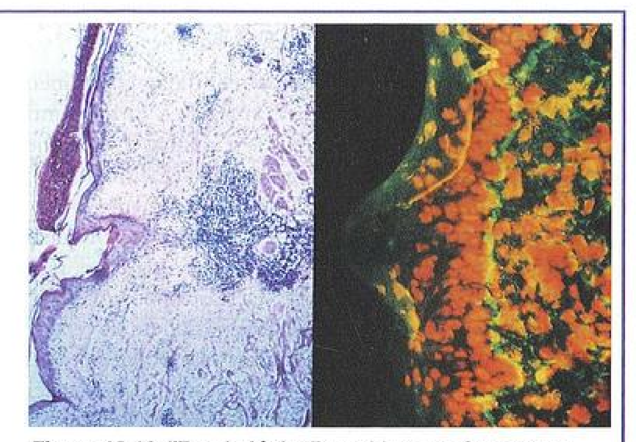


Figura 18.19. "Banda lúpica" en el lupus eritematoso sistémico (LES).

Izquierda: corte de piel que muestra engrosamiento leve de la unión dermoepidérmica con células inflamatorias diseminadas subyacentes y un foco inflamatorio mayor en las capas más profundas. Tinción con hematoxilina y eosina con poco aumento. *Derecha*: tinción con verde fluorescente en una biopsia de piel que se observa con mayor aumento y revela el depósito de complejos que contienen IgG (el anticuerpo anti-C3 produce la misma imagen) sobre la membrana basal en la unión dermoepidérmica. (Cortesía de D. Isenberg.)

acción de los agregados inmunitarios en el riñón y la circulación. El depósito de complejos es diseminado, como denota el nombre, y aunque el 40% de los pacientes desarrolla por último lesiones renales, la piel está comprometida en el 98% de los casos (Figura 18.19), las articulaciones y los músculos en igual porcentaje, los pulmones en el 64%, la sangre y el cerebro en el 60% y el corazón en el 20%.

La producción espontánea de anticuerpos anti-dsDNA también es una característica predominante en los modelos animales de LES, como ratones NZB × W y MRL/lpr, que desarrollan una enfermedad mortal por inmunocomplejos. La afinidad alta y la clase IgG de estos anticuerpos, así como el mejoramiento de los síntomas y la reducción de los inmunocomplejos contra los glomérulos renales después del tratamiento de los ratones NZB × W con DNAsa I o anti-CD4, son pruebas convincentes de una patología mediada por complejos inducidos por antígenos y dependiente de células T. Sin embargo, como el DNA en sí no es un antígeno timodependiente y entre los autoanticuerpos del LES se detecta un grupo dirigido contra antígenos del nucleosoma físicamente unidos, se puede pensar en un mecanismo de "transporte a cuestas", del tipo ilustrado en la Figura 18.9. Teniendo en cuenta que aparecen "vesículas" de nucleosoma sobre la superficie de las células apoptósicas que contienen fragmentos de cromatina (DNA más histonas) y que la expansión espontánea de poblaciones de células T específicas para el nucleosoma precede al comienzo clínico del LES, un escenario probable podría implicar la internalización del material del nucleosoma capturado sobre los receptores superficiales de las células B anti-DNA, la presentación de los complejos entre el péptido histona procesado y las moléculas de clase II del CMH a las células T *helper* específicas para las histonas y la proliferación clonal de las células formadoras de anticuerpos contra el DNA (Figura 18.20). Se demuestran complejos de anticuerpos anti-DNA con material del nucleosoma circulante, que se unen a través de la histona al heparansulfato extracelular, donde se pueden acumular y dañar órganos diana, como los glomérulos renales.

Artritis reumatoide

Evidencias morfológicas de la actividad inmunitaria

Los cambios articulares en la artritis reumatoide son, en esencia, producidos por el crecimiento invasivo de las células sinoviales que forman un tejido de granulación (***pannus***) que recubre y destruye el cartílago y el hueso (Figura 18.21a-e). La membrana sinovial que rodea y mantiene el espacio articular se vuelve intensamente celular como consecuencia de la hiperreactividad inmunitaria considerable, como lo revelan las grandes cantidades de células T, sobre todo de CD4, en diversos estadios de activación, asociadas por lo general con las células dendríticas y los macrófagos (Figura 18.21f); se observan con frecuencia cúmulos de plasmocitos e incluso folículos secundarios con centros germinativos, como si la sinovial se convirtiera en un ganglio linfático activo (Figura 18.21g-j). Hay una expresión diseminada de HLA-DR de superficie (de clase II); las células T y B, las células dendríticas y las de revestimiento sinovial son positivas, lo cual indica actividad intensa (Figura 18.21k). Esta reactividad inmunitaria poderosa representa un estímulo intenso para las células del revestimiento sinovial, las cuales experimentan una transformación en el tejido de granulación sinovial invasivo que conduce a la erosión articular a través de la liberación de mediadores de la destrucción. También pueden desarrollarse nódulos reumatoides granulomatosos (Figura 18.21l,m).

Vesícula — DNA — Histona — Clq/SAP — CPA — Th2 — Colaboración — Captación — B — C3 — Heparan-sulfato — GN

Célula apoptósica con vesículas nucleosómicas	Depuración defectuosa	"Exceso" de nucleosomas	Respuesta autoinmunitaria desregulada	Célula T específica contra histona activada	Célula B específica anti-DNA	Síntesis de anti-DNA	Inmunocomplejo nucleosómico	Unión al glomérulo	Daño del órgano efector

Figura 18.20. Probable mecanismo patogénico que conduce a la lesión de los órganos diana en el lupus eritematoso sistémico (LES).

Los nucleosomas derivados de las células apoptósicas pueden estimular la producción de anticuerpos anti-DNA por un mecanismo de "transporte a cuestas" en los huéspedes susceptibles. Los complejos resultantes se unen con heparansulfato en la membrana basal glomerular, donde inducen el desarrollo de glomerulonefritis. Son bien conocidas la alta incidencia de lupus en los individuos con deficiencia de C1q y la susceptibilidad de quienes padecen la enfermedad a las erupciones cutáneas cuando se exponen a los rayos UV de la luz solar que inducen apoptosis en las células de la piel. CPA, célula presentadora de antígeno; GN, glomerulonefritis; SAP, precursor de amiloide sérico.

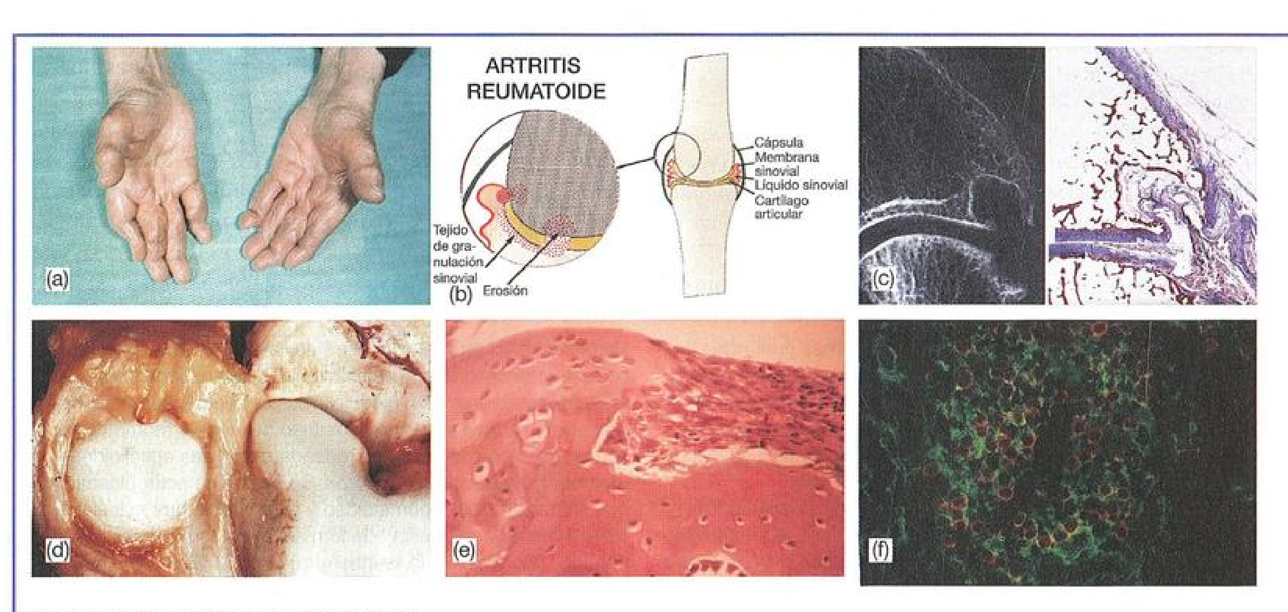


Figura 18.21. Artritis reumatoide (AR).

a) Manos de un paciente con AR crónica en las que se observan las deformidades clásicas en cuello de cisne. b) Representación esquemática de una articulación diartrósica que muestra erosiones óseas y cartilaginosas debajo del tejido de granulación sinovial (*pannus*) derivado de la membrana sinovial. c) Articulación interfalángica proximal con erosión ósea acentuada significativa y erosión marginal del cartílago. d) Tejido de granulación sinovial temprano que crece sobre la rótula. e) Histología del tejido de granulación sinovial que muestra erosión evidente del hueso y el cartílago en el margen celular. f) Sinovial reumatoide en la que se aprecian células presentadoras de antígeno positivas para la clase II (verde) en íntimo contacto con células T CD4+ (anaranjadas).

Autosensibilización contra IgG y formación de complejos inmunitarios

Los autoanticuerpos contra la región Fc de la IgG (Figura 18.22a), conocidos como **factores reumatoideos**, son los elementos característicos de la enfermedad y se detectan en casi todos los pacientes con artritis reumatoide. La mayoría tiene factores reumatoideos IgG o IgM. Se debe tener en cuenta una característica particular y extraña de los factores reumatoideos IgG, ya que son al mismo tiempo antígenos y anticuerpos con capacidad de **autoasociación** (Figura 18.22b) para formar inmunocomplejos "hermafroditas". Los agregados de IgG pueden detectarse en los tejidos sinoviales y el líquido articular, donde dan lugar a las reacciones inflamatorias agudas típicas con exudados de líquido.

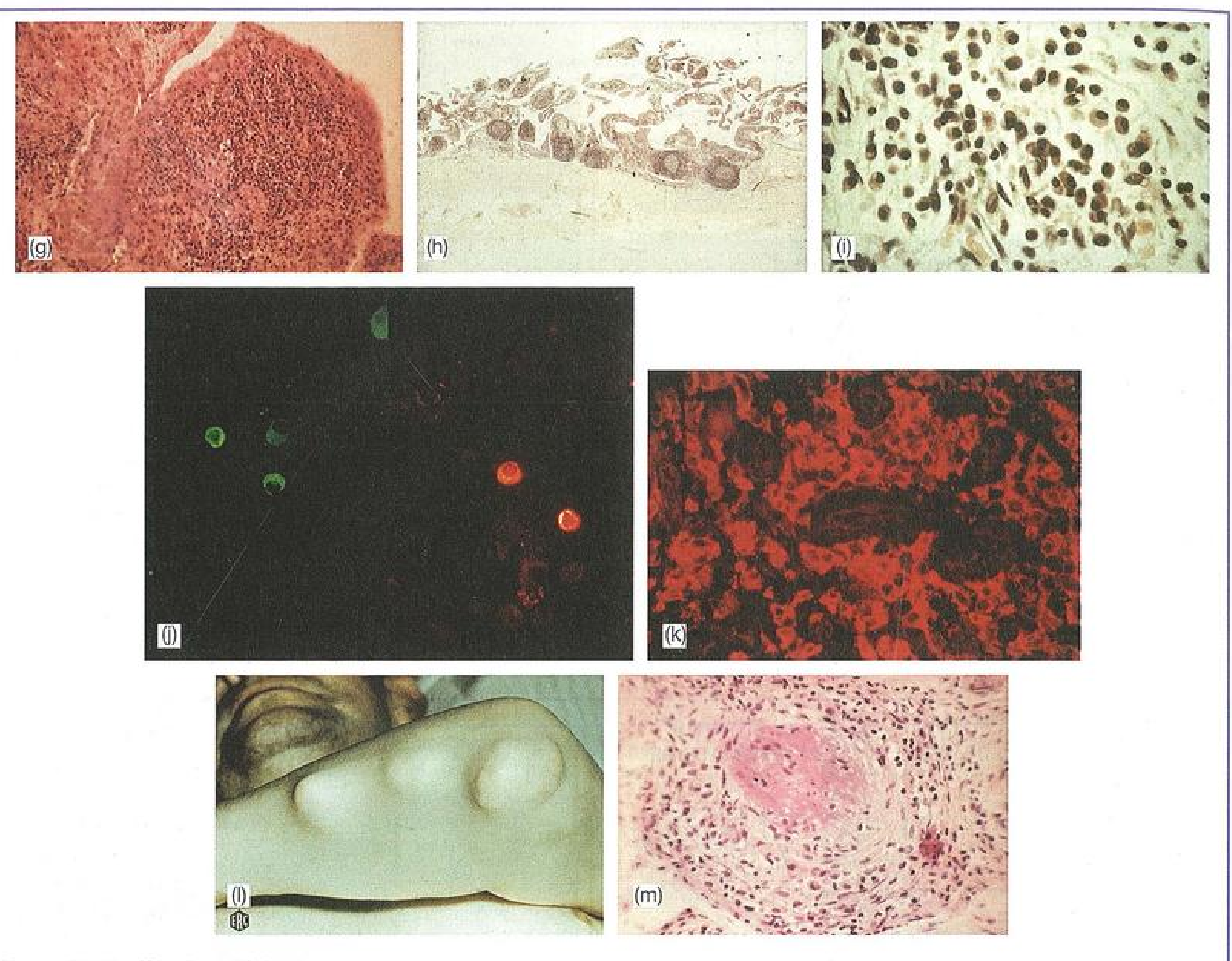


Figura 18.21. *(Continuación)*

g) Células inflamatorias crónicas en las capas más profundas de la membrana sinovial de pacientes con artritis reumatoide. h) Capa sinovial hipervellosa que muestra folículos secundarios bien formados con centros germinativos (relativamente poco frecuente). i) Vista con gran aumento de un sector de sinovial afectada que muestra colecciones de plasmocitos clásicos. j) Plasmocitos aislados del tejido sinovial teñidos simultáneamente para revelar IgM [con $F(ab')_2$ anti-µ marcado con fluoresceína] y factor reumatoideo (con agregados de Fcγ marcados con rodamina). Dos de los cuatro plasmocitos positivos para IgM parecen sintetizar factor reumatoideo. k) Sinovial reumatoide en la que se aprecia gran cantidad de células teñidas con anticuerpos anti-HLA-DR (anti-clase II). l) Nódulos reumatoideos grandes sobre el antebrazo. m) Aspecto granulomatoso del nódulo reumatoideo, con un área central necrótica rodeada de células epitelioides, macrófagos y linfocitos dispersos. Se suelen detectar plasmocitos que sintetizan factor reumatoideo y es probable que la lesión represente una respuesta a la formación de complejos insolubles anti-IgG. [Cortesía de D. Isenberg (a); de L.E. Glynn (c-e, g-i); de G. Janossy (f, k) y de P. Youinou y P Lydyard (j).]

El porcentaje de azúcares Fcγ exentos por completo de galactosa en los pacientes con artritis reumatoide juvenil y del adulto es casi siempre más alto que en los controles. Ha quedado bien establecido que las mujeres embarazadas con artritis reumatoide experimentan remisión de la enfermedad a medida que se aproximan al término, pero ésta se exacerba en el posparto. Cuando la artritis remite, los valores de agalacto-IgG disminuyen, pero cuando la enfermedad empeora después del parto, la agalacto-IgG se torna anormal otra vez, lo que sugiere un compromiso íntimo con el proceso patológico.

Producción de daño tisular

Como se explica en el epígrafe de la Figura 18.22, los inmunocomplejos se pueden estabilizar con moléculas de unión al Fcγ multivalentes, factor reumatoideo IgM y C1q y, cuando están presentes en el espacio articular, pueden provocar el aflujo de neutrófilos que conducen a la liberación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y enzimas lisosómicas, como proteasas neutras y colagenasa, que pueden **dañar el cartílago articular** por la ruptura de proteoglucanos y fibrillas de colágeno. El daño será mayor si los complejos se adhieren al cartílago, ya que los neutrófilos se unen pero no pueden internalizarlos ("fagocitosis frustrada"); como consecuencia, se liberan hidrolasas lisosómicas hacia el espacio extracelular entre la célula y el cartílago, donde están protegidas de la acción de inhibidores enzimáticos como la α_2-macroglobulina.

Los agregados también pueden estimular a células del tipo de los macrófagos presentes en el revestimiento sinovial, sea en forma directa a través de sus receptores de superficie o de

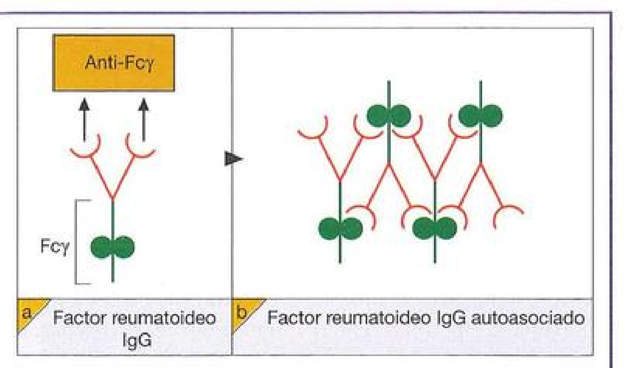


Figura 18.22. Complejos autoasociados de factor reumatoideo IgG.

a,b) Aunque con afinidad relativamente baja, la intensidad de la unión es reforzada por el "efecto de bonificación" de la adhesión recíproca y, además, estos complejos en la articulación se podrían estabilizar por la presencia de factor reumatoideo (IgM anti-Fcγ) y C1q que tienen sitios de unión polivalentes para la IgG.

manera indirecta mediante fagocitosis y resistencia a la digestión intracelular. En este punto es importante señalar que la liberación de citocinas como TNF y GM-CSF por las células T activadas (véase más adelante) da lugar a una estimulación potente de los macrófagos. Las células sinoviales activadas proliferan para formar un tejido de granulación sinovial (*pannus*) sobre el cartílago (Figura 18.21d), y en el margen de este tejido de granulación que avanza se puede observar su ruptura (Figura 18.21e), que casi con certeza se debe a la liberación de enzimas, especies reactivas del oxígeno y en especial IL-1, IL-6 y TNF. Los macrófagos activados también secretan activador del plasminógeno, y la plasmina que se forma como consecuencia activa a la colagenasa latente producida por las células sinoviales. Los productos secretados por los macrófagos estimulados pueden activar condrocitos (las células que segregan y mantienen el cartílago) a fin de exacerbar **la degradación del cartílago**, y osteoclastos que estimulan la **resorción ósea**, otra complicación de la enfermedad grave (Figura 18.21c).

Hipersensibilidad mediada por células T como factor patógeno en la enfermedad autoinmunitaria

Otra vez la artritis

La membrana sinovial inflamada en forma crónica alberga a una población densa de células T activadas, y su función fundamental en la enfermedad es destacada por los efectos beneficiosos de los tratamientos con ciclosporina y anticuerpos anti-CD4. Las concentraciones elevadas de IL-15 dentro de la membrana sinovial pueden llevar al reclutamiento y la activación de las células T cuya secreción de citocinas y la capacidad de inducir la síntesis de TNF e IL-15 en los macrófagos da lugar al desarrollo intenso del tejido de granulación sinovial, con la consecuente erosión del cartílago y el hueso (Figura 18.21e). En sí, los condrocitos pueden ser también dianas de la enfermedad.

Los antecedentes antigénicos de la **artritis reactiva** se pueden analizar con mayor facilidad porque es desencadenada después de una infección urinaria o del aparato genital por *Chlamydia trachomatis* o del tubo digestivo por *Yersinia, Salmonella, Shigella* o *Campylobacter.* Todos estos microorganismos son bacterias intracelulares estrictas o facultativas, por lo que pueden evitar el sistema inmunitario ocultándose dentro de las células. Sin embargo, es posible que se trate de mimetismo molecular. La infección natural de ratones por *Salmonella typhimurium* estimula la producción de células T CD8 citotóxicas que reconocen un epítopo inmunodominante de la molécula GroEL, presentada por la clase Ib Qa-1 y que reacciona en forma cruzada con un péptido proveniente de la hsp60 de origen murino, que de este modo permite la reacción con los macrófagos estimulados. En los seres humanos, los individuos con HLA-B27 tienen un riesgo particular de desarrollar artritis reactiva, y la importancia del componente microbiano se confirma en experimentos realizados en ratones que portan el transgén HLA-B27; si crecen en un ambiente exento de microorganismos, sólo se producen lesiones en la piel, pero en las condiciones microbiológicas silvestres naturales del animal normal, se ven afectados la piel, el intestino y las articulaciones. ¿Por qué, al igual que en la artritis reumatoide, las articulaciones son diana de esta enfermedad y qué hace B27? Sólo una de cada 300 células T de la membrana sinovial de pacientes con artritis reactiva es CD8 y, en consecuencia, está limitada a la clase I. Podría ocurrir que una secuencia de B27 que reacciona en forma cruzada actúe como epítopo críptico para perpetuar un estímulo microbiano único con una respuesta autoinmunitaria amplificada.

Otra enfermedad reumatológica íntimamente asociada con el HLA-B27 es la **espondilitis anquilosante.** Recién en los últimos tiempos se describieron autoanticuerpos en esta enfermedad con especificidad para varias proteínas de los tejidos conectivos y esqueléticos. Los efectos beneficiosos del tratamiento con anti-TNF indican una participación importante de esta citocina en la patogenia de la enfermedad. A pesar de la asociación muy firme con las moléculas de clase I, los estudios en ratas transgénicas HLA-B27, un modelo para la espondilitis anquilosante humana, indican que las células T citotóxicas $CD8^+$ no participan en la patogenia de la enfermedad. En su lugar, la tendencia de las moléculas HLA-B27 para plegarse de modo erróneo en el retículo endoplasmático y la consiguiente dimerización conducen a la formación de proteína desplegada que lleva a la producción excesiva de IL-23 por las células Th17 tras la activación del receptor de reconocimiento de patrón. Los polimorfismos del gen del receptor para IL-23 se asocian con el desarrollo de espondilitis anquilosante en los seres humanos.

Endocrinopatía específica de órgano

Enfermedad de Hashimoto

El infiltrado inflamatorio de la enfermedad de Hashimoto (véase la Figura A18.1.1c) representa una expresión de hipersensibilidad mediada por células T. La demostración de moléculas de clase II en las células epiteliales tiroideas de los pacientes y la presencia de células Th1 específicas para el

antígeno en la glándula tiroides implica la participación de estas células. La destrucción de las células epiteliales tiroideas puede implicar la ocupación de Fas sobre su superficie, con la inducción consiguiente de la apoptosis.

Apelaremos de nuevo a los modelos de animales para aportar más evidencias, aun cuando indirectas. La eliminación de células T en la cepa Obesa de pollos (OS) impidió el desarrollo espontáneo de tiroiditis y, en el nivel de las células diana, el umbral para la inducción de moléculas de clase II del CMH sobre las células tiroideas OS por IFnγ fue mucho menor que el informado para las células normales, lo cual refuerza la noción de que una anomalía tiroidea es un factor contribuyente para el fenotipo de susceptibilidad. El otro modelo, en el cual la tiroiditis es inducida por la tiroglobulina en adyuvante completo de Freund (véase la Figura A18.1.1b), se puede transferir a receptores histocompatibles vírgenes con clones de células T $CD4^+$ específicas para péptidos que contienen tiroxina.

Diabetes tipo I

Al igual que la tiroiditis autoinmunitaria, la diabetes tipo 1 se caracteriza por infiltrado inflamatorio crónico y destrucción del tejido específico, que en este caso corresponde a las células β de los islotes de Langerhans del páncreas, productoras de insulina. El retraso en el comienzo de la enfermedad cuando se administra un tratamiento temprano con ciclosporina, en dosis que ejercen un efecto escaso sobre la producción de anticuerpos, indica que las células T efectoras actuarían como agentes de destrucción, ya que este fármaco influye en forma específica sobre la síntesis de citocinas por las células T. Las respuestas *in vitro* de las células T contra los antígenos de las células de los islotes con participación de la ácido glutámico descarboxilasa reflejan en forma directa el riesgo de progresión hacia la diabetes clínica. La intensidad de los factores de riesgo asociados con ciertos alelos HLA-DQ también sugiere la acción de las células T.

Para conocer con más precisión el ataque celular y la destrucción de las células β de los islotes, es preciso volver al **ratón diabético no obeso (NOD),** que desarrolla espontáneamente una enfermedad diabética que se asemeja estrechamente con la diabetes tipo 1 humana en lo referente a sus variedades de respuestas autoinmunitarias y la asociación de la ruptura de los islotes con el infiltrado inflamatorio crónico por células T y macrófagos (Figura 18.23). Muchas de las células T que infiltran los islotes de los ratones diabéticos tienen un perfil de citocinas del tipo Th1 y pueden transferir la enfermedad a receptores NOD congénitos para la mutación para la inmunodeficiencia combinada grave (*IDCG*). Sin embargo, también se implicaron con firmeza los aumentos de IL-21 proveniente de Th17 que resultan de los polimorfismos asociados con NOD en el sitio de unión del factor de transcripción Sp1 en la región promotora del gen *IL-21*.

Hasta el 50% de las células T infiltrantes aisladas de islotes de ratones NOD prediabéticos es específica para la insulina y puede transferir la enfermedad a los ratones NOD más jóvenes. Sin embargo, también se pueden recuperar células T específicas para la ácido glutámico descarboxilasa que también resultan diabetógenas.

La ácido glutámico descarboxilasa presente en el sistema nervioso central y el periférico produce ácido γ-aminobutírico (GABA), un neurotransmisor inhibidor importante proveniente de la glutamina. Los autoanticuerpos contra la ácido glutámico descarboxilasa no sólo se observan en la diabetes tipo 1, sino también en el **síndrome del hombre rígido**, en el cual hay un defecto en las vías GABAérgicas que controlan la actividad de las neuronas motoras. Los anticuerpos no pueden ser patógenos porque hay ácido glutámico descarboxilasa en la superficie interna de la membrana plasmática, pero las células T sí podrían ser patógenas. Es una incógnita la manera en que el cerebro se puede convertir en una diana específica en lugar de los islotes pancreáticos, pero el 30% de los pacientes desarrolla diabetes tipo 1.

Esclerosis múltiple

Desde hace tiempo, se ha afirmado que la esclerosis múltiple podría ser una enfermedad autoinmunitaria debido a las similitudes morfológicas con la encefalomielitis autoinmunitaria experimental (originalmente descrita por el nombre alternativo de encefalomielitis autoalérgica experimental). Esta enfermedad desmielinizante se produce mediante la inmunización con mielina, en general la proteína básica de mielina (MBP) en adyuvante completo de Freund, que causa parálisis motora (Figura 18.24). Los clones de células T específicas para la MBP son capaces de transferir la enfermedad, pero esto se puede exacerbar mediante la inyección de un anticuerpo monoclonal contra el virus de Theiler, agente de la encefalomielitis murina, que reacciona en forma cruzada con un epítopo sobre la mielina y los oligodendrocitos. Es probable que la célula T promueva una inflamación local que afecta a las células endoteliales en la barrera hematoencefálica y permite el acceso de los anticuerpos al tejido cerebral.

En los seres humanos, el fenotipo caucásico DR2 determinado por serología (DRB1*15:01, DQA1* 01:02, DQB1* 06:02) se asocia estrechamente con la susceptibilidad a la esclerosis múltiple. Además, al menos el 37% de las células T activadas que responden a IL-2 e IL-4 en el líquido cefalorraquídeo es específico para componentes de la mielina, en comparación con el 5% en los individuos con otros trastornos neurológicos. Se encontró un motivo con una secuencia de aminoácidos Leu-Arg-Gly en alrededor del 40% de los reordenamientos de TCR Vβ5.2 N(D)N en células T de lesiones de esclerosis múltiple en un clon Vβ5.2 citotóxico para células diana que contenían el péptido 89-106 de la proteína básica de mielina. Estas teorías alientan a seguir intentando con las pruebas de inducción de tolerancia.

Algunas otras enfermedades con actividad autoinmunitaria

Ataques al sistema vascular

El rasgo característico de la **granulomatosis de Wegener** es una vasculitis granulomatosa necrosante asociada con la presencia de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (cANCA; Figura 18.25). Aunque estos autoanticuerpos están dirigidos contra la proteasa III intracelular de los grá-



(a) (b) (c) (d)

Figura 18.23. Destrucción de las células β de los islotes pancreáticos por células T infiltrantes en el ratón diabético no obeso (NOD).

a) Islote normal indemne. b) Infiltrado temprano alrededor del islote. c) Penetración del islote por células T infiltrantes. d) Destrucción casi completa de las células productoras de insulina con sustitución por células T invasoras. Insulina teñida con anticuerpos conjugados con rodamina y células T con anticuerpos anti-CD3 marcados con fluoresceína. (Datos reproducidos de Quartey-Papafio R y cols. [1995] *Journal of Immunology* **154**, 5567-5575; fotografías gentilmente provistas por J. Phillips.)

nulos primarios de los neutrófilos, el cebado de éstas con TNF causa la translocación de la proteasa hacia la superficie celular. El autoanticuerpo entonces activa la célula y causa su desgranulación, con la liberación de varias enzimas proteolíticas, y la generación de especies reactivas del oxígeno que, juntas, dañan el endotelio de los vasos sanguíneos y, por consiguiente, determinan las lesiones vasculíticas.

La **arteritis de células gigantes** (a veces denominada como arteritis temporal porque con frecuencia está afectada la arteria temporal) es una vasculitis de las arterias de tamaño grande y mediano que afecta a alrededor de 1 de cada 500 individuos mayores de 50 años. Recibe su nombre por la presencia de células gigantes multinucleadas que se producen como consecuencia de la fusión de macrófagos. Se considera que las células dendríticas, los macrófagos y las células T CD4+ en la lesión son fundamentales en la patogenia. Los autoantígenos supuestos son presentados por las células dendríticas a las células Th1, cuya producción copiosa de IFNγ determina que los macrófagos segreguen IL-1β e IL-6. Asimismo, los macrófagos activados también producen especies reactivas del oxígeno y metaloproteasas de la matriz que dan por resultado el daño de los vasos sanguíneos. Además, el IFNγ estimula a las células gigantes para producir factor de crecimiento endotelial (VEGF) que favorece el crecimiento de los capilares, y el interferón también determina que tanto las células gigantes como los macrófagos convencionales segreguen el factor derivado de las plaquetas (PDGF) que conduce a la proliferación de las células de la íntima que forman el revestimiento interno del vaso sanguíneo. El antígeno es incierto, pero la enfermedad está firmemente asociada con el HLA-DR4 y es exquisitamente sensible a la administración de dosis elevadas de corticoides.

La **esclerodermia**, que también se denomina **esclerosis sistémica**, se divide en dos subgrupos principales, la esclerodermia cutánea limitada en la que, como lo sugiere su nombre, las lesiones suelen estar limitadas a la piel, y la esclerodermia cutánea difusa en la que también se observa daño en órganos internos. Ambas formas están caracterizadas por el aumento de los depósitos de colágeno y otros componentes de la matriz que causan fibrosis extensa de la piel y los órganos internos centrada alrededor de las arterias de pequeño calibre y de la microvasculatura que, por último, produce oclusión capilar. La patogenia es poco conocida, pero la presencia de autoanticuerpos contra el centrómero, el nucléolo y la topoisomerasa-1 (Scl-70) sugiere cierta participación importante de elementos autoinmunitarios; las lesiones están

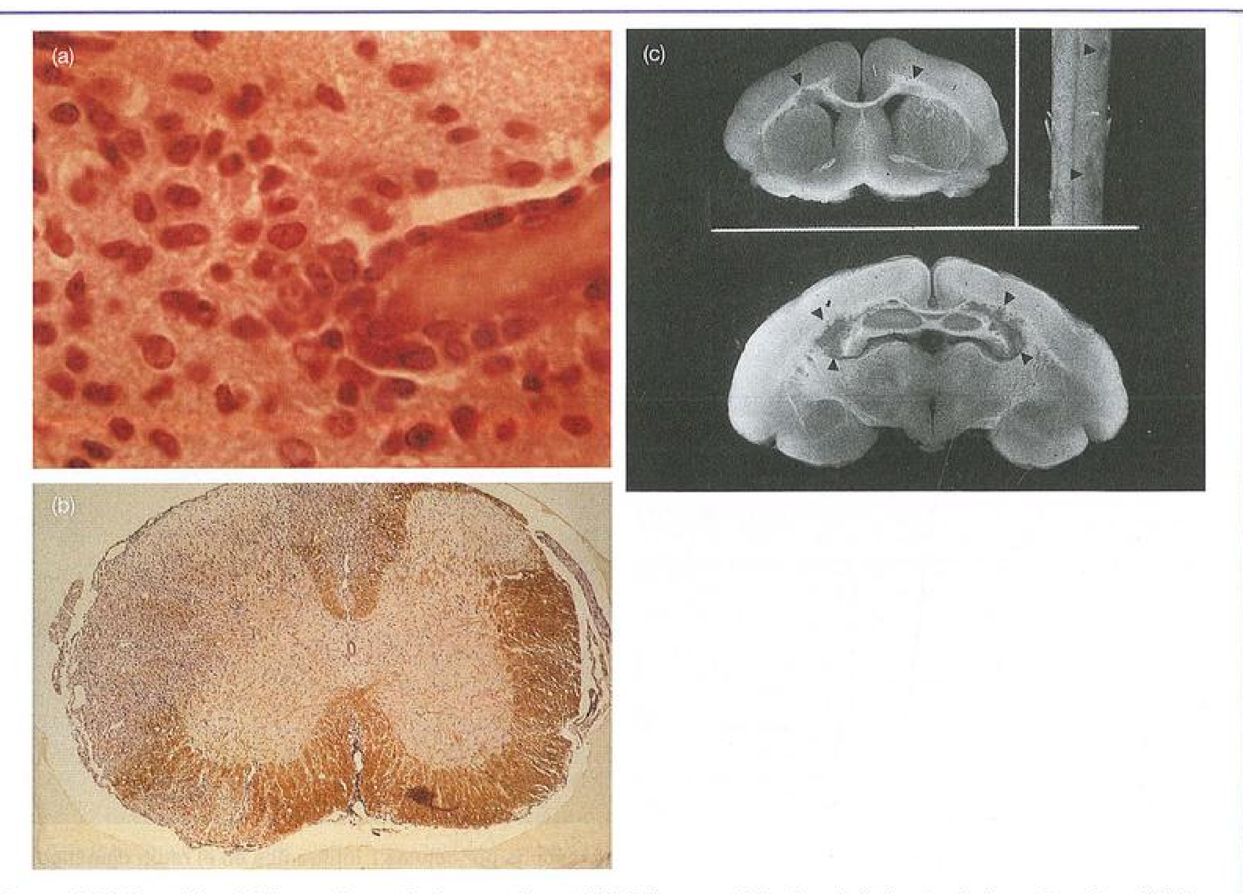


Figura 18.24. Encefalomielitis autoinmunitaria experimental (EAE), un modelo desmielinizante de la esclerosis múltiple inducido por inmunización con antígenos cerebrales en adyuvante completo de Freund.

a) Lesión temprana de la EAE en una rata de 9 días después de su inmunización con homogeneizado de medula espinal en adyuvante completo de Freund. La lesión en la sustancia blanca del cerebro, que probablemente tuviera algunas horas de evolución, revela un infiltrado perivenoso de linfocitos y monocitos (inflamación mononuclear pura) con células que invaden el parénquima nervioso. La mielina no se ha teñido. b) Médula espinal lumbar de rata con EAE crónica después de su inmunización con proteína proteolipídica de la mielina. Lesiones desmielinizantes grandes en las columnas dorsales, tanto a la izquierda (grande) como a la derecha (pequeña), y en la región inferoizquierda. Además, la sustancia gris presenta inflamación activa, que afecta sobre todo el asta dorsal izquierda. La mielina normal se tiñe de color pardo. c) EAE crónica recidivante en cobayos. Placas desmielinizadas grandes en la sustancia blanca del cerebro (flecha) muy semejantes a las placas de la esclerosis múltiple. [Epígrafe e imágenes proporcionadas por B. Waksman; (b) originalmente de Trotter, y (c) de Lassmann y Wisniewski.]

infiltradas por células T y B, macrófagos y mastocitos. Las células T son, en su mayoría, del fenotipo Th2, y las células B pueden contribuir a la producción de TGFβ e IL-6. Las mutaciones en el gen de la fibrilina-1, que codifica una proteína de la matriz extracelular, podrían desempeñar una función importante al aumentar el depósito de polímeros de esta proteína, que se sabe impulsan la actividad profibrótica del TGFβ.

Las **placas ateroscleróticas** son lesiones focales de las arterias elásticas y musculares de gran tamaño que causan engrosamiento de la íntima y están compuestas por una capa fibrosa subendotelial de colágeno y tejido conectivo con abundante matriz, células espumosas (macrófagos cargados de lípidos) y células musculares lisas en proliferación. La ruptura de una placa lleva a la trombosis. En las lesiones también hay células T, sobre todo del fenotipo Th1, células B, macrófagos, células dendríticas, mastocitos y neutrófilos. Esto llevó a la noción de que la aterosclerosis puede ser una enfermedad autoinmunitaria. Los candidatos antigénicos principales son la lipoproteína de baja densidad (LDL), la proteína del choque térmico (hsp) y la β_2-glucoproteína-1. Los receptores depuradores de los macrófagos captan el LDL oxidado, que comprenden los componentes proinflamatorios malondialdehído y aldehído 4-hidroxinonenal y, entonces, pueden presentar estos autoantígenos a las células T. Además, se considera que los inmunocomplejos que contienen IgG, LDL oxidado y β_2-glucoproteína-1 son proaterógenos. También es importante señalar que la inmunización con hsp65 micobacteriana induce lesiones ateroscleróticas en los sitios sometidos a estrés hemodinámico importante y la dieta con alto contenido de colesterol las empeora. Se producen anticuerpos y células Th1 que reaccionan con la hps60 humana (Figura 18.26) debido a la homología sustancial de su secuencia con la hsp65 micobacteriana. Si esto fuera aceptado en forma general, la aterosclerosis, con una prevalencia del 1,7% en los Estados Unidos, sería clasifica-

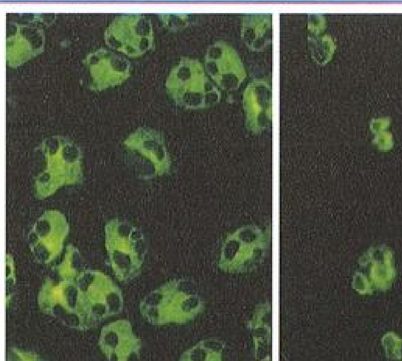
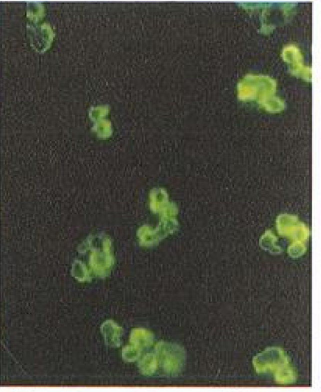



Figura 18.25. Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA).

Izquierda: tinción citoplasmática difusa de cANCA específica para proteasa III en la granulomatosis de Wegener; *derecha:* tinción perinuclear de p-ANCA por anticuerpos contra la mieloperoxidasa en pacientes con poliarteritis nudosa. Los neutrófilos fijados se trataron primero con el suero del paciente y luego con anti-IgG humana conjugada con fluoresceína. (Cortesía de G. Cambridge.)

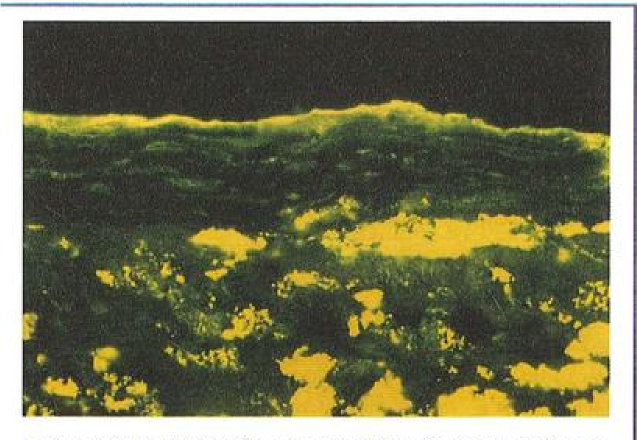


Figura 18.26. Expresión de la proteína de choque térmico 60 en una lesión arteriosclerótica humana temprana.

Corte por congelación no fijado de 4 μm de espesor de una estría adiposa (= lesión inicial) de una arteria carótida humana teñida con inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo monoclonal contra la proteína de choque térmico 60 y un segundo anticuerpo marcado con fluoresceína. Se evidencia una reacción intensa con las células endoteliales y con células que infiltran la íntima, por ejemplo, células espumosas. (Aumento original ×400.) (Cortesía de G. Wick.)

da casi como la enfermedad autoinmunitaria más frecuente.

Posibles enfermedades autoinmunitarias de la piel

Ya hemos mencionados algunas enfermedades autoinmunitarias con compromiso cutáneo, como la fibrosis observada en la esclerodermia y el exantema en alas de mariposa característico del lupus eritematoso sistémico. El mixedema pretibial se observa en algunos pacientes con enfermedad de Graves, y la formación de ampollas aparece en el pénfigo tanto vulgar como foliáceo. La evidencia de que estas diversas situaciones representan enfermedades autoinmunitarias es bastante firme. Sin embargo, hay otras enfermedades que afectan la piel que también podrían ser autoinmunitarias. Por lo tanto, aunque en la actualidad está poco claro si la inflamación crónica de la **psoriasis**, una enfermedad que afecta a cerca del 2% de la población, está impulsada por un agente infeccioso, un autoantígeno o una respuesta a las células con estrés o daño, sin dudas hay un intenso compromiso inmunitario. Si se confirma la patología autoinmunitaria, entonces la psoriasis se ubicaría directamente en la parte superior del listado que figura en el Cuadro 18.2. El compromiso inmunitario se pone de relieve por la infiltración de células dendríticas y células T de las placas psoriásicas, en las que la integrina $\alpha_1\beta_1$ sobre las células T se une con el colágeno de tipo IV presente en la membrana basal de la epidermis. Muchas de estas células T pertenecen a la subpoblación Th17 y segregan IL-17A e IL-22; se sabe que esta última citocina es un inductor potencial de la proliferación de queratinocitos. La eficacia terapéutica de los anticuerpos contra el TNF o contra el componente compartido p40 de las citocinas heterodiméricas IL-12 e IL-23 sólo actúan para reforzar la contribución inmunitaria de esta enfermedad.

Se propuso un componente autoinmunitario para los trastornos de la pigmentación cutánea observados en el **vitíligo.** Debe señalarse que esta enfermedad tiene una incidencia mayor en pacientes con enfermedades autoinmunitarias conocidas, sobre todo con enfermedad de Graves. Por cierto, la presencia de células T autorreactivas y anticuerpos contra los melanocitos plantean sospechas. De particular interés es el descubrimiento de anticuerpos bloqueadores contra el receptor hormonal 1 que concentra melanina, aunque todavía debe identificarse una función directa en la patogenia.

Medición de los autoanticuerpos

En las Figuras 6.8, 6.29, 6.30 y 18.1 se ilustran algunas de las pruebas empleadas en la detección de autoanticuerpos. A menudo, los autoanticuerpos séricos son marcadores diagnósticos valiosos. El cribado del suero puede llevarse a cabo mediante técnicas de inmunofluorescencia en cortes de tejido congelado. Se dispone de pruebas de aglutinación para factores reumatoideos y para anticuerpos contra tiroglobulina, peroxidasa tiroidea y eritrocitos, y de métodos de ELISA para anticuerpos contra el factor intrínseco, DNA, IgG, antígenos nucleares extraíbles y otros. Se desarrollaron técnicas de ELISA en miniplacas con antígenos clonados de genes purificados o ensayos de láser direccionables (ALBA; *addressable laser bead assays*) que comenzaron a suplantar la necesidad de las pruebas de inmunofluorescencia, que requieren más tiempo y capacitación.

Las pruebas de detección de autoanticuerpos también serán útiles en el cribado de personas en riesgo, por ejemplo, familiares de pacientes con enfermedades autoinmunitarias como diabetes tipo 1 en la que los anticuerpos contra GAD, IA2 e insulina son predictivos de enfermedad futura (sobre todo si están presentes los tres anticuerpos). Lamentablemente, hasta

este momento no está totalmente claro lo que se puede hacer para prevenir la enfermedad que surge en los parientes que presentan autoanticuerpos.

Opciones terapéuticas

Autoinmunidad específica de órgano

Resulta natural que la mayoría de los enfoques terapéuticos tenga como base la manipulación de las respuestas inmunitarias (Figura 18.27). Sin embargo, en muchas enfermedades específicas de órganos, el control metabólico suele ser suficiente, como el tratamiento restitutivo con tiroxina en la tiroiditis autoinmunitaria (enfermedad de Hashimoto y tiroiditis atrófica), con insulina en la diabetes tipo 1, con vitamina B_{12} en la anemia perniciosa. En la enfermedad de Graves, pueden administrarse fármacos antitiroideos que bloquean la acción de la peroxidasa tiroidea necesaria para la producción de hormona tiroidea o, de modo alternativo, realizar la ablación tiroidea con ^{131}I o mediante un enfoque quirúrgico con tiroidectomía subtotal. Los fármacos anticolinesterasa son utilizados con frecuencia para el tratamiento a largo plazo de la miastenia grave, y la timectomía es también una opción con eficacia bien establecida. El trasplante de los islotes pancreáticos puede usarse para la diabetes tipo 1, aunque con todos los problemas asociados con cualquier injerto, es decir, escasa cantidad de donantes, necesidad de compatibilizar el HLA y necesidad de fármacos inmunosupresores potencialmente perjudiciales. Un enfoque que se está investigando mucho es la encapsulación de los islotes para prevenir el rechazo del aloinjerto.

Sobre la base de la posibilidad de que la esclerosis múltiple tenga un origen viral, se trató a los pacientes con IFNβ; las tasas de recidiva de la enfermedad con crisis y remisiones se redujeron a la tercera parte, y éste se convirtió en un tratamiento habitual para esta forma de la enfermedad. Sin embargo, sólo tienen un efecto modesto en la enfermedad progresiva. Es probable que en la esclerosis múltiple el IFNβ no actúe principalmente como un antiviral, sino que ejerza funciones antiinflamatorias e inmunomoduladoras mediante acciones variadas sobre las células T. El natalizumab, un

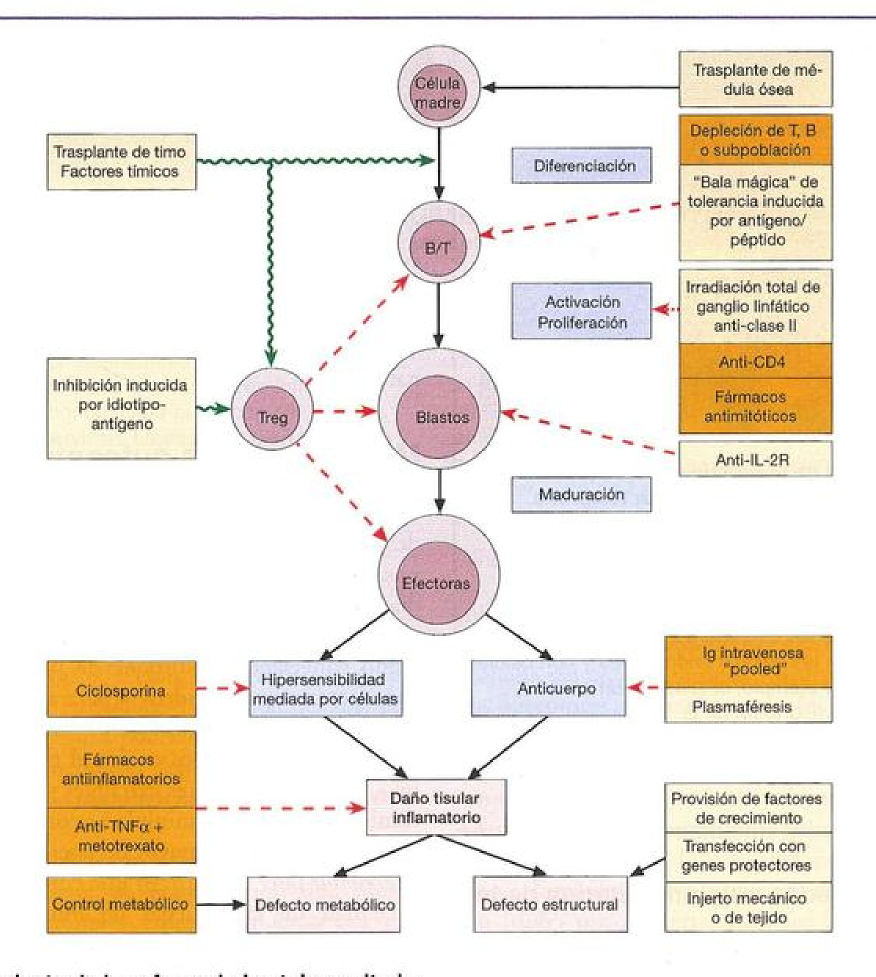


Figura 18.27. Tratamiento de la enfermedad autoinmunitaria.

Los tratamientos convencionales actuales se representan en color anaranjado oscuro; algunos enfoques que se podrían poner en práctica se presentan en recuadros de color anaranjado más claro. (En el caso del trasplante de hígado, en la parte inferior derecha, el tratamiento inmunosupresor utilizado podría proteger al tejido del daño autoinmunitario que afectó al órgano que debió ser sustituido.)

anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra la α_4-integrina, puede reducir el número de recidivas en dos tercios, aunque plantea el riesgo de desencadenar leucoencefalopatía multifocal progresiva, un cuadro que en realidad exacerba la degradación de la mielina. En consecuencia, sólo se lo utiliza en pacientes con esclerosis múltiple que presentan remisiones y recidivas y que no respondieron de modo adecuado al IFNβ y en pacientes con enfermedad grave con remisiones y recidivas y evolución rápida.

Fármacos antirreumáticos que modifican la enfermedad

Los fármacos antiinflamatorios no esteroides (AINE) son eficaces para reducir la inflamación, pero tienen escaso efecto sobre la progresión de la enfermedad. Los pacientes con artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunitarias responden bien a dosis altas de corticoides, pero tienen efectos colaterales con el uso a largo plazo. Los fármacos antirreumáticos que modifican la enfermedad, como el metotrexato (MTX), la sulfasalazina, las sales de oro y la leflunomida, pueden ser eficaces. Por ejemplo, el metabolito activo de la leflunomida inhibe la síntesis *de novo* de rUMP, lo que lleva a una detención en G_1 del ciclo de proliferación de los linfocitos.

Un progreso importante en el tratamiento provino cuando se determinó la neutralización muy eficaz del TNF con un anticuerpo monoclonal, lo que revela la función de esta citocina en la patogenia. Tras esta observación, se aprobaron tres agentes anti-TNF para su uso en la artritis reumatoide: infliximab, un anticuerpo monoclonal quimérico ratón-humano anti-TNF; adalimumab, anticuerpo monoclonal humano anti-TNF; y etanercept, una proteína de fusión de la región de unión del ligando extracelular del receptor para el TNF y la porción Fcγ de la IgG. Estos fármacos anti-TNF pueden usarse de manera eficaz en combinación con metotrexato (Figura 18.28).

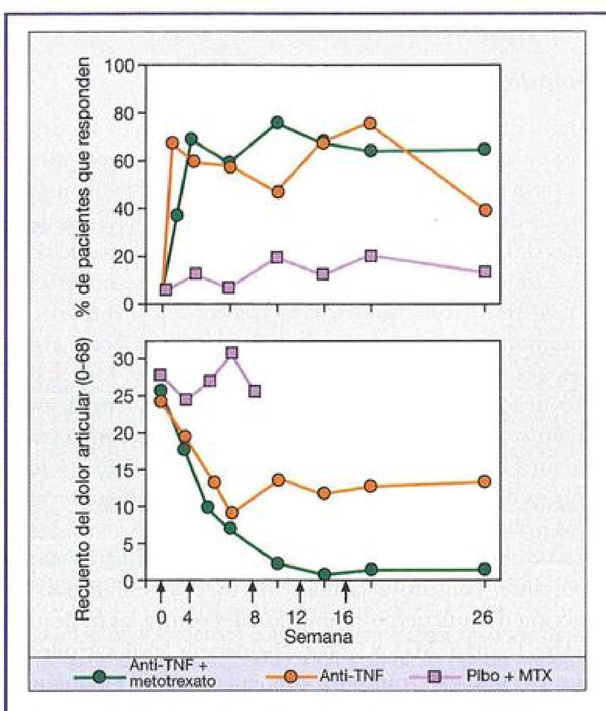


Figura 18.28. Combinación de anticuerpo anti-TNF y metotrexato en el tratamiento de la artritis reumatoide.

Panel superior: duración de la respuesta al tratamiento definida por los criterios de Paulus del 20% en tres dosis de anticuerpos monoclonales quiméricos anti-TNF (infliximab) con metotrexato (MTX) o sin éste y con placebo (Plbo) más MTX. Los resultados ilustran la proporción (%) de pacientes que responden en las semanas 1, 2, 4, 8, 12, 16 y 26. La respuesta de Paulus se logra por una mejoría del 20% en cuatro de los seis criterios siguientes: puntuaciones de dolor y tumefacción de la articulación, duración de la rigidez matinal, velocidad de eritrosedimentación y mejoría de dos grados en la evaluación de la gravedad de la enfermedad por un observador y el paciente. Panel inferior: mediciones seriadas (valores medianos) del recuento del dolor articular antes (día 0), durante (semanas 1 a 14) y después (semanas 14 a 26) del tratamiento. Los resultados abarcan sólo hasta el punto en que ≥ 50% de los pacientes permanece en el ensayo (hasta 6 semanas en el grupo que recibió placebo más MTX). Las flechas indican el momento en que se infundió el infliximab durante las semanas 0, 2, 6, 10 y 14. El metotrexato se administró una vez por semana y casi se anuló la producción de anticuerpos contra el anticuerpo quimérico humano. Se debe señalar la normalización de la función defectuosa de las células T reguladoras con este tratamiento (véase la Figura 18.13). [Datos proporcionados por cortesía de R.N. Maini, M. Feldmann y cols., véase Maini R.N. y cols. (1998) *Arthritis and Rheumatism* **41**, 1552-1563. Reproducida con autorización de Lippincott, Williams y Wilkins, MD, USA.]

Fármacos antimitóticos

Los fármacos antimitóticos inespecíficos convencionales como la azatioprina, la ciclofosfamida y el metotrexato, en general combinados con corticoides, se han empleado con éxito en enfermedades como LES, artritis reumatoide, hepatitis crónica activa y anemia hemolítica autoinmunitaria, entre otras.

En cierto sentido, como la ciclosporina bloquea la secreción de citocinas en las células T, es un fármaco antiinflamatorio y, puesto que las citocinas como IL-2 también son obligatorias para la proliferación de los linfocitos, la ciclosporina es asimismo un fármaco antimitótico. Este medicamento tiene eficacia comprobada en la uveítis, la diabetes tipo 1 temprana, el síndrome nefrótico y la psoriasis, y eficacia moderada en la púrpura trombocitopénica idiopática, el LES, la polimiositis, la cirrosis biliar primaria y la miastenia grave.

La administración intravenosa de altas dosis de ciclofosfamida con corticotropina (ACTH u hormona adrenocorticotrófica) o la irradiación total de los ganglios linfáticos a través de su efecto sobre el sistema inmunitario periférico redujeron o detuvieron el progreso de la enfermedad en alrededor de las dos terceras partes de los pacientes con esclerosis múltiple progresiva durante 1 a 2 años, lo cual indica que la enfermedad es mediada por mecanismos inmunitarios. Esta afirmación se sustenta en el hallazgo desafortunado de que, en la mayoría de los pacientes, el IFNγ exacerba la enfermedad.

Estrategias de control inmunitario

Manipulación celular

Algún día se pondrá en práctica la corrección de los defectos importantes en las células madre o en el procesamiento en el timo mediante la terapia génica, el trasplante de médula ósea o de timo o, tal vez, en el último caso, mediante hormonas tímicas. Varios centros intentan el trasplante de células madre autólogas después de la hematoinmunoablación mediante fármacos citotóxicos en pacientes con enfermedad autoinmunitaria grave en un intento de volver a cero (*reset*) la respuesta inmunitaria. En general, más de las dos terceras partes de los casos complicados de LES, esclerodermia, artritis reumatoide juvenil y del adulto y otras lograron la remisión sin fármacos. La mortalidad relacionada con el trasplante es de alrededor del 5%, comparable con la observada en los pacientes con cáncer.

Como el mecanismo de señalización de las células T es tan importante, constituye la diana de muchas estrategias. La inyección de anticuerpos monoclonales contra las moléculas de clase II del CMH y anti-CD4 detiene el desarrollo de lupus en modelos murinos con enfermedad espontánea. Algunos autores utilizan el método de anticuerpos contra el receptor de IL-2 para obtener la depleción de las células T activadas, pero a continuación se volverá a comentar el efecto prolongado de los anticuerpos anti-CD4 *que no ejercen depleción* sobre la inducción de tolerancia (Figura 16-14), en particular cuando se refuerza por la exposición repetida al antígeno. Es evidente que el refuerzo antigénico constituye una característica permanente de las enfermedades autoinmunitarias, por lo cual el anticuerpo anti-CD4 sería ideal para tratar entidades en las que las células CD4 aún aceptan las señales de "desactivación" naturales inductoras de tolerancia. El abaracept, que fue aprobado para su uso en la artritis reumatoide, es una proteína de fusión del dominio extracelular de CTLA-4 con Fcγ. Su unión a CD80 y CD86 bloquea la acción de moléculas coestimuladoras, lo que conduce a la anergia de las células T.

El tratamiento de pacientes con esclerosis múltiple que presentan recidivas y remisiones con alemtuzumab (Campath-1H, un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD52) produjo una reducción muy significativa y sorpresivamente persistente en las cifras de células T; cerca del 80% de los pacientes no mostró recidivas en el período de 3 años después del tratamiento. Este resultado se compara con el valor cercano al 50% de los pacientes que reciben IFNβ. Es necesario sopesar esta mejoría en relación con los efectos colaterales del tratamiento con alemtuzumab que incluye la precipitación del desarrollo de púrpura trombocitopénica idiopática o de enfermedad de Graves en algunos pacientes.

Si se tiene en cuenta que los inmunocomplejos del factor reumatoideo son los principales protagonistas en la patogenia de las lesiones articulares de la artritis reumatoide, la lógica sugiere la aplicación del método radical de ablación de las células B con rituximab, un anticuerpo monoclonal quimérico murino-humano anti-CD20, como se emplea en el tratamiento de la leucemia de células B. Estas células también pueden participar como células presentadoras de antígeno para la activación de células T y son, de hecho, la fuente de anticuerpos contra péptidos/proteínas citrulinados que de modo característico se asocian con la artritis reumatoide. Los resultados exitosos de los ensayos clínicos llevaron a la aprobación del rituximab para su uso, en combinación con metotrexato, en pacientes con artritis reumatoide que no respondieron de modo adecuado al tratamiento con anti-TNF (Figura 18.29). Se investiga su posible uso futuro para el tratamiento similar en LES, síndrome de Sjögren y dermatomiositis-polimiositis.

Manipulación de los mediadores reguladores

Algunos modelos espontáneos de enfermedad autoinmunitaria se pueden corregir con inyecciones de citocinas: la

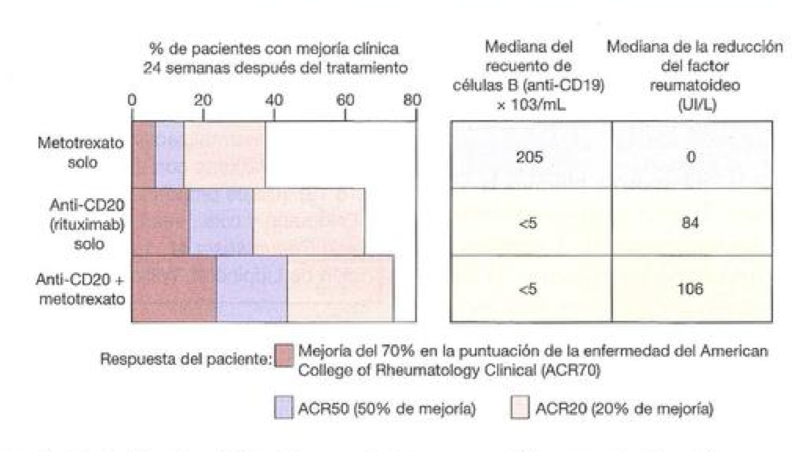


Figura 18.29. Tratamiento de depleción de células T en pacientes con artritis reumatoide activa.

El rituximab, un anticuerpo monoclonal humanizado específico para la célula B CD20, puede actuar en combinación con los agentes antimitóticos ciclofosfamida y metotrexato para producir una mejoría marcada de la enfermedad. (Adaptado de Edwards J.C.W. y cols. [2004] *New England Journal of Medicine* **350**, 2572-2581.)

IL-1 lleva la curación de la diabetes en los ratones NOD, el TNF evita el establecimiento de síntomas de LES en híbridos NZB × W y el factor transformador del crecimiento β1 (TGFβ1) protege contra la artritis por colágeno y la encefalomielitis autoinmunitaria experimental recidivante. La acción de la citocina puede ser bloqueada mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos, versiones solubles de receptores o antagonistas naturales. Ya describimos el uso de anti-TNF. Se han aprobado otras sustancias biológicas que tienen como diana mediadores reguladores para el tratamiento de la artritis reumatoide como anakinra, un antagonista del receptor para IL-1, recombinante no glucosilado, y tocilizumab, un anticuerpo humanizado contra el receptor de IL6. También se investigan los anticuerpos monoclonales contra IL-15, IL-17 y la subunidad p40 compartida de IL-12/23 en cuanto a su eficacia en la artritis reumatoide, ya que son inhibidores de la molécula pequeña de las cinasas de la transducción de la señal p38, JAK3 y syk implicadas en la activación de los linfocitos.

Mezcla de inmunoglobulina normal

La **inyección intravenosa de mezcla de Ig proveniente de varios miles de donantes normales** se ha utilizado desde hace tiempo para el tratamiento de pacientes con inmunodeficiencias que afectan las células B. Sin embargo, en la década de los años 1980 se descubrió que también tiene un efecto beneficioso en varias enfermedades autoinmunitarias como trombocitopenia idiopática, esclerosis múltiple, dermatomiositis y miastenia grave. Los efectos inhibidores de las fracciones $F(ab')_2$ en pacientes con autoanticuerpos contra el factor procoagulante VIII sugiere una participación posible de las reacciones antiidiotipicas. Sin embargo, en un modelo animal de artritis reumatoide (que implica la inyección de suero inductor de artritis proveniente de ratones transgénicos K/B × N en ratones C57Bl/6), la administración de Fcγ ya sea producido en forma bioquímica o recombinante, que posee glucanos 2,6-sialilados redujo la inflamación, tal vez debido a la expresión aumentada del inhibidor de FcγRIIb.

Manipulación con antígenos

El objetivo es presentar una concentración suficiente del antígeno ofensivo en una forma que desactive la respuesta autoinmunitaria. Como se adjudicó a las células T un papel fundamental, parece natural diseñar una estrategia para los epítopos de las células T en lugar del antígeno entero, lo cual es una propuesta mucho más práctica porque reduce el problema de manejar péptidos relativamente cortos. Una estrategia consiste en diseñar análogos peptídicos de alta afinidad (ligandos peptídicos alterados) que se unirán de modo tenaz con la molécula del CMH apropiada y antagonizarán la respuesta al autoantígeno. Puesto que se expresan varias moléculas diferentes del CMH, esto no debería alterar indebidamente las defensas del microorganismo. Sin embargo, ahora se habla de pacientes y no de ratones, y esto podría significar dosis muy altas repetidas del péptido aunque, a favor de la teoría anterior, se conoce bien la estructura química de los péptidos y su producción es *relativamente*

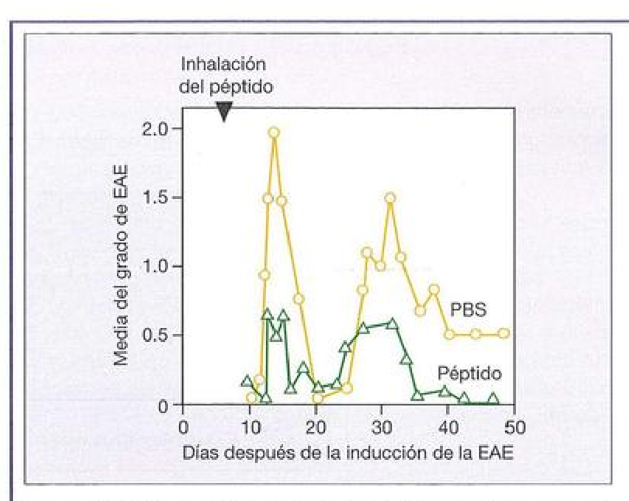


Fig. 18.30. Influencia de la inhalación de péptido sobre el desarrollo de la encefalomielitis autoinmunitaria experimental (EAE) inducida con médula espinal de cerdo en adyuvante completo de Freund.

Se inhalaron aerosoles con el péptido 8 días después de la inyección del encefalitógeno. Una sola dosis puede brindar protección prolongada, que se extiende de manera indefinida si se procede a la timectomía de los ratones. La regulación depende de IL-10 y se puede inducir tolerancia tanto de Th1 como de Th2. La administración de un epítopo para la célula T compuesto por un solo péptido puede inducir tolerancia a otros epítopos autoantigénicos de la misma proteína (supresión asociada) y contra otros epítopos en diferentes antígenos dentro del tejido nervioso utilizado para la inmunización (tolerancia circunstancial). PBS, solución fisiológica amortiguada con fosfato; el péptido era un 11-mer N-terminal acetilado de la proteína básica de mielina con una lisina en la posición 4 sustituida por alanina. (Datos de Metzler B. y Wraith D.C. [1996] *Annals of New York Academy of Science* **778**, 228-242, con autorización de los editores.)

económica. La supresión de las células T específicas de antígenos sería beneficiosa al respecto, y se podría administrar el péptido bajo la protección del anticuerpo anti-CD4 o utilizar agonistas parciales. La inyección de un péptido de la proteína básica de mielina, en particular como un derivado palmitoilado insertado en liposomas, puede impedir la instalación de la encefalomielitis autoinmunitaria experimental, y un péptido hsp60 puede prevenir el comienzo de la diabetes en el ratón NOD.

Ya se señaló que, como la superficie mucosa del intestino queda expuesta a incontables microorganismos con gran capacidad inmunógena y los enterocitos son más vulnerables a la lesión por IFNγ y TNF, es importante que las defensas inmunitarias del intestino adopten mecanismos para eliminar las respuestas de tipo Th1. Este objetivo se logra mediante la estimulación de las células que liberan citocinas, como TGFβ, IL-4 e IL-10 y suprimen las respuestas indeseables. En consecuencia, la incorporación de los antígenos debe inducir tolerancia para las células Th1 y se comprobó que esta es una estrategia exitosa para impedir la aparición de encefalomielitis autoinmunitaria experimental, el modelo de artritis inducida por colágeno II y el desarrollo de diabetes en ratones NOD. Se obtuvieron resultados promisorios en ensayos clínicos en los

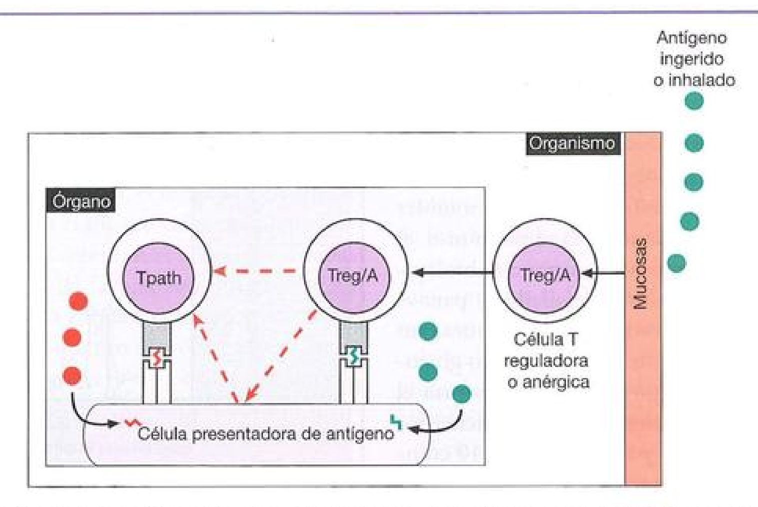


Figura 18.31. Tolerancia circunstancial relacionada con el órgano, inducida por la ingestión o la inhalación de un autoantígeno relacionado con un órgano.

Las células T reguladoras o anérgicas inducidas (Treg/A) específicas para sustancias capaces de inducir tolerancia ingresan en el órgano e inhiben a las células T patógenas (T pat) en la misma célula presentadora de antígeno que procesa la sustancia inductora de tolerancia y al otro antígeno del órgano reconocido por la célula patógena. Los reguladores actúan a través de la producción de IL-10 y tal vez de TGFβ, que inhiben las célula Th1, sea en forma directa o a través de un efecto intermedio sobre la célula presentadora de antígeno.

que los pacientes con artritis reumatoide son alimentados con colágeno de pollo de tipo II.

La sustancia inductora de tolerancia también se puede administrar por medio de inhalación de aerosoles peptídicos (Figura 18.30); esta podría ser una forma muy atractiva de suprimir las células T específicas para los antígenos en muchos estados de hipersensibilidad. La inducción de anergia o la supresión activa podrían contribuir en diversos grados. Los péptidos por vía intranasal se emplearon con éxito para impedir el desarrollo de artritis inducida por colágeno, encefalomielitis autoinmunitaria experimental, diabetes espontánea (NOD) en modelos murinos. El tratamiento puede ser eficaz incluso *después* de la inducción de la enfermedad (Figura 18.30), aunque en los seres humanos, una vez establecida, esto podría ser más difícil de lograr y podría requerir un tratamiento suplementario; por ejemplo, con anticuerpos anti-CD4, y la reducción preliminar de las células T sensibilizadas (cebadas) con ciclosporina o corticoides. Hay muchas alternativas para elegir.

El comentario siguiente es muy importante. Un solo epítopo interno de la proteína básica de mielina puede inhibir la enfermedad inducida por la *mezcla* de epítopos o antígenos contenidos dentro de toda la mielina. En otras palabras, un solo epítopo puede inducir la supresión de las células T patógenas específicas para otros epítopos sobre la misma molécula u otras, siempre que se produzcan en el mismo órgano o región. En una sección anterior, este mecanismo se denominó **tolerancia circunstancial relacionada con el órgano** (*bystander tolerance*), un fenómeno que se comprende mejor en función de sus interacciones sobre la misma célula presentadora de antígenos entre la célula reguladora, Th2 o anérgica, que reconoce al epítopo supresor, y la célula Th1 patógena, que reconoce un **epítopo separado** procesado a partir de la misma molécula o de otra molécula del mismo órgano (Figura 18.31).

RESUMEN

- El sistema inmunitario mantiene un equilibrio muy precario entre las respuestas eficaces contra los antígenos ambientales y el control regulador de un conjunto de respuestas potencialmente suicidas contra las moléculas propias.

Espectro de las enfermedades autoinmunitarias

- Entre el 5 y el 8% de los individuos desarrolla enfermedad autoinmunitaria.
- En la enfermedad autoinmunitaria **específica de órgano**, ejemplificada por la tiroiditis de Hashimoto, la enfermedad de Graves y la diabetes tipo 1, los autoantígenos diana y las lesiones están limitadas a un órgano en particular. En las **enfermedades autoinmunitarias no específicas de órgano (sistémicas)**, como el lupus eritematoso sistémico (LES) y la artritis reumatoide, los autoanticuerpos tienen una reactividad amplia y las lesiones implican el depósito de inmunocomplejos circulantes.
- Con bastante frecuencia, los pacientes desarrollan más de una enfermedad autoinmunitaria.

Influencias genéticas y medioambientales

- Las enfermedades autoinmunitarias en general implican varias contribuciones genéticas que comprenden polimorfismos asociados con el HLA, autoantígenos, receptores de reconocimiento de patrón (PRR), citocinas, receptores para citocina, moléculas coestimuladoras y de señalización y factores de transcripción.

- El 75% de las enfermedades autoinmunitarias se produce en mujeres, con mayor frecuencia entre la pubertad y la menopausia.
- Durante el embarazo, pueden aparecer cambios en la intensidad de la enfermedad.
- El control por retroalimentación de los linfocitos a través del circuito citocinas-hipotálamo-hipófisis-glándula suprarrenal puede ser defectuoso, como se observa en la artritis reumatoide y algunas otras enfermedades autoinmunitarias.
- Estudios en gemelos refuerzan la importancia de las contribuciones genéticas, pero también indican una firme influencia medioambiental.
- Están implicados factores medioambientales tanto microbianos como no microbianos.

Mecanismos

- La enfermedad autoinmunitaria representa la ruptura en la tolerancia inmunitaria.
- El autoantígeno parece dirigir la respuesta.
- Casi todos los autoantígenos están fácilmente accesibles al sistema inmunitario, pero sólo algunos, como las proteínas del cristalino y de los espermatozoides, están secuestrados (ocultos).
- El desarrollo de anticuerpos mutados de alta afinidad y las respuestas inmunitarias contra grupos de antígenos relacionados anatómicamente indican con firmeza que las células B seleccionan los autoantígenos.
- Las células T específicas para los péptidos propios presentados en general en concentraciones bajas (epítopos crípticos) pueden no ser eliminadas en el timo.
- La modificación anormal del autoantígeno, la reacción cruzada con antígenos exógenos o el reconocimiento de los epítopos para células T y su "transporte a cuestas" pueden proporcionar epítopos nuevos para las células T *helper* no inducidas a la tolerancia.
- Las células B y T pueden ser estimuladas directamente por activadores policlonales, como el virus de Epstein-Barr o los superantígenos.
- En varias enfermedades autoinmunitarias, están implicadas las células Treg Foxp3+.
- La desrepresión de los genes de clase II que dan origen a la expresión celular inadecuada de moléculas de clase II puede ayudar a perpetuar las reacciones autoinmunitarias cebadas en un inicio por las células dendríticas.
- En las enfermedades autoinmunitarias, a menudo se observan desequilibrios de las citocinas.

Efectos patogénicos de los autoanticuerpos humorales

- Se considera que los autoanticuerpos desempeñan una función central en muchas enfermedades autoinmunitarias, como la anemia hemolítica autoinmunitaria, la púrpura trombocitopénica idiopática, la enfermedad de Graves, la miastenia grave, la anemia perniciosa y el síndrome de Goodpasture.
- La transferencia pasiva de la enfermedad se comprueba en "experimentos de la naturaleza", en los cuales el pasaje transplacentario de autoanticuerpos IgG maternos causa un trastorno comparable pero transitorio en el feto y el neonato (p. ej., enfermedad de Graves, miastenia grave).
- La enfermedad también se puede reproducir en modelos animales mediante la transferencia pasiva de autoanticuerpos monoclonales.

Efectos patogénicos de los complejos con autoantígenos

- Los inmunocomplejos, en general con el complemento unido, aparecen en los riñones, la piel y las articulaciones de los pacientes con LES y se asocian con lesiones en los órganos correspondientes.
- La mayoría de los pacientes con artritis reumatoide produce autoanticuerpos contra la IgG (factores reumatoideos) que se autoasocian para formar complejos.
- Esto origina inflamación aguda del espacio articular y estimula a las células del revestimiento sinovial a crecer como **tejido de granulación (*pannus*)** que **produce erosiones en el cartílago y el hueso subyacente** a través de la liberación de IL-1, IL-6, TNF, colagenasa, proteasa y especies reactivas del oxígeno.

Hipersensibilidad mediada por células T como factor patógeno

- La supresión de la enfermedad mediante la administración de ciclosporina o el tratamiento con anticuerpos anti-CD4 es una prueba poderosa a favor de la participación de la célula T. Así, es un factor de riesgo relacionado con el HLA.
- El punto de vista prevalente es que las lesiones inflamatorias específicas de órgano se producen por la acción de células Th1 patógenas autorreactivas, las células Th17 o ambas.
- Las células T activadas son abundantes en la membrana sinovial reumatoide y su producción de TNF y GM-CSF complementa el estímulo de los inmunocomplejos para la formación del tejido de granulación (*pannus*).
- Las células epiteliales tiroideas a menudo expresan moléculas de clase II del CMH en la enfermedad autoinmunitaria tiroidea, y las células Th1 infiltran la glándula.
- El hecho de que la autoinmunidad pueda ocasionar tiroiditis se confirma además por la inducción deliberada de la enfermedad en roedores mediante la inmunización con antígenos tiroideos en adyuvante completo de Freund.
- El comienzo de la diabetes tipo 1 se retrasa cuando se administra ciclosporina, y son importantes los factores de riesgo del HLA-DQ.
- Las células Th1 de ratones NOD enfermos, que simulan el trastorno humano en cuanto a la histopatología y la autoinmunidad, pueden producir lesiones pancreáticas típicas en ratones jóvenes de la misma cepa. La IL-21 proveniente de las células Th17 también desempeña una función importante.
- La similitud con la encefalomielitis autoinmunitaria experimental, una enfermedad desmielinizante inducida por la inmunización de roedores con mielina en adyuvante completo de Freund, determina que la autoinmunidad sea la hipótesis principal en la esclerosis múltiple. Alrededor de una tercera parte de las células T activadas por IL-2 o IL-4 en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con esclerosis múltiple es específica para la mielina y el fenotipo HLA-DR2 es un factor de riesgo destacado.

Algunas otras enfermedades con un componente autoinmunitario

- Las lesiones vasculares mediadas por mecanismos inmunitarias tienen una importancia fundamental en la granulomatosis de Wegener, la arteritis de células gigantes, la esclerodermia y la aterosclerosis.

- El pénfigo y el vitíligo también son enfermedades autoinmunitarias.

Medición de los autoanticuerpos

- Se cuenta con una amplia variedad de autoanticuerpos séricos como marcadores diagnósticos útiles.
- Las pruebas de ELISA en fase sólida, sobre todo en forma de microplacas, se emplean para investigar autoanticuerpos. Las pruebas de cribado por inmunofluorescencia pueden llevarse a cabo en cortes de tejido normal.
- Las pruebas de aglutinación para factores reumatoideos y los ensayos de láser direccionables (ALBA) están entre las otras pruebas diagnósticas más empleadas.
- La investigación de autoanticuerpos puede predecir la aparición futura de enfermedad autoinmunitaria en los familiares cercanos de diabetes tipo 1.

Tratamiento de los trastornos autoinmunitarios

- El tratamiento convencional consiste en el control metabólico y el uso de fármacos antiinflamatorios e inmunosupresores.
- El tratamiento con anti-TNF logró un éxito significativo en la artritis reumatoide.
- Se encuentra en etapa de investigación intensa una amplia variedad de posibles tratamientos basados en el control inmunitario. Comprenden la eliminación total de células B y T y los intentos para inducir tolerancia específica del antígeno.
- Podría ser de gran beneficio el restablecimiento de la actividad defectuosa de las células Treg.
- La tolerancia circunstancial relacionada con el órgano significa que los epítopos solos pueden inducir supresión de las células patógenas dentro de un órgano que reacciona contra otros epítopos en el mismo antígeno o en otro.

LECTURAS ADICIONALES

Bugatti S., Codullo V., Caporali R. & Montecucco C. (2007) B cells in rheumatoid arthritis. Autoimmunity Reviews 7, 137–142.

Chapel M., Haeney M., Misbah S. & Snowden N. (2006) Essentials of Clinical Immunology, 5th edn. Blackwell Publishing, Oxford.

Cunningham M.W. (2009) Molecular mimicry. In Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester http://www.els.net/ DOI: 10.1002/9780470015902.a0000958.pub2

Eizirik D.L., Colli M.L. & Ortis F. (2009) The role of inflammation in insulitis and β-cell loss in type 1 diabetes. Nature Reviews Endocrinology 5, 219–226.

Guilherme L. & Kalil J. (2010) Rheumatic fever and rheumatic heart disease: cellular mechanisms leading to autoimmune reactivity and disease. Journal of Clinical Immunology 30, 17–23.

Marsh S.G. et al. (2010) Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. Tissue Antigens 75, 291–455.

Masters S.L., Simon A., Aksentijevich I. & Kastner D.L. (2009) Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease. Annual Review of Immunology 27, 621–668.

Nestle F.O., Kaplan D.H. & Barker J. (2009) Psoriasis. The New England Journal of Medicine 361, 496–509.

Oh S., Rankin A.L. & Caton A.J. (2010) $CD4^{+}CD25^{+}$ regulatory T cells in autoimmune arthritis. Immunological Reviews 233, 97–111.

Pascual V., Chaussabel D. & Banchereau J. (2010) A genomic approach to human autoimmune diseases. Annual Review of Immunology 28, 535–571.

Rahman A. & Isenberg D.A. (2008) Systemic lupus erythematosus. The New England Journal of Medicine 358, 929–939.

Rose N.R. & Mackay I.R. (eds.) (2006) The Autoimmune Diseases, 4th edn. Elsevier, Oxford.

Tha-In T. et al. (2008) Modulation of the cellular immune system by intravenous immunoglobulin. Trends in Immunology 29, 608–615.

Zenewicz L.A., Abraham C., Flavell R.A. & Cho J.H. (2010) Unraveling the genetics of autoimmunity. Cell 140, 791–797.

Glosario

Acetato miristato de forbol (*phorbol myristate acetate*; PMA): éster de forbol mitógeno que estimula directamente la proteincinasa C y actúa como estimulador tumoral.

Adresina: molécula de adhesión celular presente sobre la superficie luminal del endotelio de los vasos sanguíneos y linfáticos, y reconocida por moléculas de asentamiento que dirigen los leucocitos a los tejidos con la "dirección" adecuada.

Adresinas vasculares: moléculas de adhesión celular presentes en la superficie luminal del endotelio de los vasos sanguíneos y linfáticos reconocidas por moléculas de asentamiento (*homing*) que dirigen los leucocitos a los tejidos con la "dirección" adecuada.

Adyuvante: cualquier sustancia que intensifica de manera inespecífica la respuesta inmunitaria contra un antígeno.

Adyuvante de Freund: el adyuvante completo de Freund es una emulsión de un antígeno acuoso en vaselina líquida que contiene micobacterias muertas por calor; el adyuvante incompleto de Freund carece de micobacterias.

Afinidad (afinidad intrínseca): fuerza de unión (constante de afinidad) entre un receptor (p. ej., un sitio de unión con el antígeno en un anticuerpo) y un ligando (p. ej., el epítopo en un antígeno).

Alelo: variantes de un gen polimorfo en un locus genético dado.

Alérgeno: antígeno que causa alergia.

Alergia: hipersensibilidad mediada por IgE, como asma, eccema, fiebre del heno y alergias a los alimentos.

Alergia atópica: hipersensibilidad mediada por IgE, por ejemplo, asma, eccema, fiebre del heno y alergias a los alimentos.

Alogénico: hace referencia a las diferencias genéticas entre individuos de la misma especie.

Aloinjerto: injerto de tejido u órgano entre individuos alogénicos.

Alotipo: variante alélica de un antígeno que, como no se encuentra en todos los individuos, puede ser inmunógeno en miembros de la misma especie que tienen una versión diferente del alelo.

Aminas vasoactivas: sustancias, como la histamina y la 5-hidroxitriptamina, que aumentan la permeabilidad vascular y la contracción de los músculos lisos.

Anafilaxia: reacción de hipersensibilidad, a menudo mortal, desencadenada por la desgranulación de los mastocitos mediada por IgE o la anafilatoxina, que produce shock anafiláctico debido a vasodilatación y contracción de los músculos lisos.

Anafilotoxina: sustancia (p. ej., C3a, C4a o C5a) capaz de desencadenar directamente la desgranulación de los mastocitos.

Anergia: tolerancia inmunitaria específica, que puede ser reversible, en la que el linfocito pierde la capacidad de respuesta funcional.

Antígeno: cualquier molécula capaz de ser reconocida por un anticuerpo o receptor de célula T.

Anticuerpo biespecífico: anticuerpo híbrido producido de manera artificial en el que cada uno de los dos brazos de unión al antígeno es específico para un epítopo antigénico diferente. Estos anticuerpos pueden producirse mediante entrecruzamientos químicos o técnicas de DNA recombinante, y se usan para unir dos antígenos o células diferentes, por ejemplo, una célula T citotóxica y una célula tumoral.

Antígeno CD: denominación de los grupos de diferenciación (*cluster of differentiation*) asignados a las moléculas de superficie de los leucocitos, que se identifican mediante un grupo determinado de anticuerpos monoclonales.

Anticuerpo fluorescente: anticuerpo conjugado con un colorante fluorescente, por ejemplo, FITC.

Anticuerpo humanizado: anticuerpo monoclonal de origen no humano obtenido por ingeniería genética en el que todas las secuencias de CDR, salvo las de unión al antígeno, fueron remplazadas por secuencias provenientes de anticuerpos de seres humanos. Este procedimiento se lleva a cabo para reducir al mínimo la inmunogenicidad de los anticuerpos monoclonales terapéuticos.

Anticuerpo monoclonal: anticuerpo homogéneo derivado de un único clon de células B, por lo que todos poseen sitios idénticos de unión al antígeno y el mismo isotipo.

Antígeno de diferenciación: molécula de superficie celular expresada en un estadio de desarrollo particular o sobre células de determinado linaje.

Roitt's Essential Immunology, Twelfth Edition. Peter J. Delves, Seamus J. Martin, Dennis R. Burton, Ivan M. Roitt.

Antígeno oncofetal: antígeno cuya expresión suele estar restringida al feto, pero que puede expresarse en el curso de enfermedades malignas en los adultos.

Antígeno timodependiente: antígeno que requiere células T *helper* para generar una respuesta de anticuerpos.

Antígeno timoindependiente: antígeno capaz de inducir una respuesta de anticuerpos en ausencia de células T.

Antígenos menores de histocompatibilidad: péptidos procesados no codificados por el CMH provenientes de los productos alogénicos de los locus génicos polimorfos. Junto con las moléculas codificadas por el CMH, contribuyen al rechazo de injerto, aunque por lo general no es tan intenso como el debido a la incompatibilidad por el CMH.

Antígenos Qa: moléculas de clase I "no clásicas" del CMH de ratones.

Antígenos tumorales: antígenos cuya expresión está asociada con células tumorales.

Apoptosis: forma de muerte celular programada, caracterizada por la digestión del DNA con endonucleasa.

Autólogo: proveniente del mismo individuo.

Avidez (afinidad funcional): fuerza de unión entre dos moléculas (p. ej., anticuerpo y antígeno), que tiene en cuenta la valencia de la interacción; por lo tanto, la avidez siempre será igual o mayor que la afinidad intrínseca (*véase* afinidad).

Balsa lipídica (*lipid raft*): subdominio de membrana, con alto contenido en colesterol y glucoesfingolípidos, en el que se concentran las moléculas que intervienen en la activación celular.

Basófilo: tipo de granulocito sanguíneo que se asemeja a los mastocitos tisulares.

BCG (bacilo de Calmette-Guérin): *Mycobacterium tuberculosis* atenuado que se utiliza como vacuna específica contra la tuberculosis y como adyuvante.

Biolística: uso de partículas pequeñas, por ejemplo oro coloidal, como vehículo para transportar agentes (fármacos, ácidos nucleicos, etc.) hacia el interior de la célula. Después de ser recubiertas por el agente o los agentes deseados, las partículas se bombardean dentro de la dermis del receptor mediante una pistola impulsada por helio.

Bolsa de Fabricio: órgano linfoide primario de las aves que se encuentra en la unión de la cloaca y el intestino posterior; constituye el sitio de maduración de las células B.

Cadena invariable: polipéptido que se une a moléculas de clase II del CMH en el retículo endoplasmático, las dirige hacia el compartimiento endosómico tardío e impide la asociación prematura con péptidos propios.

Cadena J: molécula que forma parte de la estructura de la IgM pentamérica y la IgA dimérica.

Cambio de clase: proceso por el cual una célula B cambia la clase, pero no la especificidad, de determinado anticuerpo que produce; por ejemplo, el cambio de un anticuerpo IgM a uno IgG.

Caspasas: familia de cisteinproteasas implicadas en generar apoptosis.

CD3: complejo trimérico de cadenas γ, δ y ε que, junto con un homodímero $\zeta\zeta$ o heterodímero $\zeta\eta$, actúa como unidad en la transducción de la señal para el receptor de la célula T.

CD4: glucoproteína de la superficie celular, por lo general sobre células T *helper*, que reconoce moléculas de clase II del CMH en las células presentadoras de antígeno.

CD8: glucoproteína de la superficie celular, por lo general sobre células T citotóxicas, que reconoce moléculas de clase I del CMH sobre las células diana.

Cebado: proceso por el cual se produce la sensibilización inicial al antígeno.

Célula dendrítica: se refiere a una célula dendrítica interdigitada que posee moléculas de clase II del CMH y presenta antígenos procesados a las células T que se encuentran en zonas de células T de los tejidos linfoides secundarios (*nota:* se trata de un tipo celular diferente de las células dendríticas foliculares).

Célula dendrítica folicular: célula dendrítica negativa para las moléculas de clase II del CMH y positiva para el receptor Fc, que porta inmunocomplejos sobre su superficie y es probable que intervenga en la estimulación de células B y el mantenimiento de la memoria de células B en los centros germinativos (*nota:* se trata de un tipo celular diferente de las células dendríticas interdigitadas).

Célula dendrítica interdigitada: célula dendrítica presentadora de antígeno que posee moléculas de clase II del CMH, y se encuentra en las áreas de células T de los ganglios linfáticos y el bazo (*nota:* se trata de un tipo celular diferente de las células dendríticas foliculares).

Célula formadora de placa (*plaque forming cell*; PFC): plasmocito secretor de anticuerpos detectado *in vitro* por su capacidad de producir una "placa" de eritrocitos lisados sensibilizados por el antígeno en presencia de complemento.

Célula K *(killer)*: término genérico para indicar a cualquier leucocito que media en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA).

Célula de Langerhans: célula dendrítica presentadora de antígeno que posee receptor Fc y moléculas de clase II del CMH y se encuentra en la piel.

Célula madre: citoblasto de la que derivan las células diferenciadas.

Célula madre pluripotente: célula que tiene el potencial de diferenciarse en muchos tipos celulares diferentes.

Célula NK (*natural killer*): linfocito granular de gran tamaño que no se reordena ni expresa genes de inmunoglobulinas ni de receptores de células T, pero puede reconocer y destruir ciertas células tumorales o infectadas por virus mediante CMH y en forma independiente de anticuerpo. Asimismo, es capaz de mediar en la CCDA.

Célula NKT: células linfoides NK1.1+ con morfología y contenido de gránulos intermedios entre las células T y las NK. Expresan niveles bajos de TCR $\alpha\beta$ con una cadena α invariable y especificidad de cadena β muy restringida, reconocen antígenos lipídicos y glucolipídicos presentados por la molécula no clásica similar a CMH CD1 y son poderosas productoras de IL-4 e IFNγ

Célula presentadora de antígeno (CPA): término que se utiliza con mayor frecuencia para referirse a las células que presentan el péptido antigénico procesado y las moléculas de clase II del CMH al receptor de la célula T ubicado sobre las células T CD4+, por ejemplo, células dendríticas, macrófagos, células B. Sin embargo, nótese que casi todos los tipos de células son capaces de presentar péptidos antigénicos con moléculas de clase I a las células T CD8+, por ejemplo como sucede con las células infectadas por un virus.

Célula T *helper* folicular: subpoblación de células T *helper* que dirige el desarrollo de las células B, la recombinación del cambio de clase y la supervivencia dentro de los centros germinativos.

Célula T reguladora: células T, en su mayoría CD4+, que suprimen la actividad funcional de linfocitos y células dendríticas.

Células B-1 y B-2: las dos principales subpoblaciones de linfocitos B. Las células B-1 presentan niveles elevados de IgM en su superficie, niveles menores de IgD de superficie, son CD43+, CD23− y la mayoría expresa el antígeno de superficie celular CD5; se autorrenuevan y con frecuencia secretan concentraciones elevadas de anticuerpos que se unen a diversos antígenos ("poliespecificidad") con una afinidad relativamente baja. Sin embargo, casi todas las células B son B-2, que expresan niveles bajos de IgM de superficie, mayores de IgD, no expresan CD5 y son CD43-, CD23+; se generan directamente a partir de los precursores en la médula ósea y secretan anticuerpos altamente específicos.

Células efectoras: células que desempeñan una función inmunitaria, por ejemplo, liberación de citocinas o citotoxicidad.

Células espumosas: macrófagos que han endocitado lipoproteínas de baja densidad. Están presentes de modo característico en las placas ateroscleróticas.

Células gigantes: células multinucleadas grandes derivadas de macrófagos fusionados; a menudo se las encuentra en los granulomas.

Células de Kuppfer: macrófagos tisulares fijos que revisten los sinusoides hepáticos.

Células de memoria: expansión clonal de las células T y B producidas durante una respuesta inmunitaria primaria y que son "programadas" para mediar una respuesta inmunitaria secundaria contra el antígeno original.

Células madre hematopoyéticas: células madre troncales que se autorrenuevan y son capaces de dar origen a todos los elementos corpusculares de la sangre (es decir, leucocitos, eritrocitos y plaquetas).

Centro germinativo: zonas diferenciadas dentro del ganglio linfático y el bazo donde tienen lugar la maduración de las células B y el desarrollo de la memoria inmunitaria.

Ciclofosfamida: fármaco citotóxico utilizado como inmunosupresor.

Ciclosporina: fármaco inmunosupresor específico de las células T utilizado para prevenir el rechazo de injertos.

Cininas: familia de polipéptidos liberados durante la respuesta inflamatoria que incrementan la permeabilidad vascular y la contracción del músculo liso.

Citocinas: proteínas de bajo peso molecular que estimulan o inhiben la diferenciación, la proliferación o la función de las células del sistema inmunitario.

Citofílico: que se une a las células.

Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA): reacción citotóxica en la que una célula diana recubierta por anticuerpo es destruida directamente por un leucocito portador del receptor Fc, por ejemplo célula NK, macrófago o neutrófilo.

Citotóxico: que destruye células.

Citrulinación: conversión enzimática por la peptidil arginina desaminasa de una arginina presente en una proteína a una citrulina.

Clon: células idénticas derivadas de un único progenitor.

CMH (complejo mayor de histocompatibilidad): región genética que codifica moléculas que intervienen en la presentación de antígenos a las células T. Las moléculas de clase I del CMH se encuentran en casi todas las células nucleadas, son codificadas sobre todo por los locus H-2K, D y L en ratones, y por los HLA-A, HLA-B y HLA-C en el ser humano, mientras que las moléculas de clase II del CMH se expresan en las células presentadoras de antígeno (sobre todo células dendríticas, macrófagos y células B) y son codificadas por H-2A y H-2E en ratones, y HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP en el ser humano. Las diferencias alélicas pueden asociarse con el rechazo más intenso de injertos dentro de una especie.

Complejo de ataque de membrana (*membrane attack complex*; MAC): complejo de los componentes C5b-C9 del complemento que se inserta como un poro en la membrana de las células diana y conducen a la lisis celular o la apoptosis.

Complemento: grupo de proteínas séricas, algunas de las cuales actúan en una cascada enzimática, que producen moléculas efectoras que intervienen en la inflamación (C3a, C5a), la fagocitosis (C3b) y la lisis celular (C5b-9).

Componente secretor: producto de escisión proteolítica del receptor de poli-Ig que permanece asociado con IgA dimérica en las secreciones seromucosas.

ConA (concanavalina A): mitógeno de células T.

Congénico: dícese de los animales que sólo difieren en un único locus genético.

Conjugado: complejo formado por dos o más moléculas unidas mediante enlaces covalentes (p. ej., fluoresceína conjugada con anticuerpo).

Corte y empalme diferencial: utilización y corte y empalme de exones diferentes desde un transcrito de RNA primario con el objeto de generar diferentes secuencias de mRNA.

Corteza: capa externa (periférica) de un órgano.

Cromatografía de afinidad: uso de anticuerpos (o antígenos) inmovilizados para seleccionar antígenos o anticuerpos de una mezcla. El ligando purificado luego es liberado por ruptura de la interacción antígeno-anticuerpo, por ejemplo mediante el cambio de pH.

Defensinas: familia de pequeños péptidos antimicrobianos básicos producidos por animales y vegetales.

Deleción clonal: proceso por el cual el contacto con el antígeno (p. ej., un autoantígeno) en un estadio temprano de la diferenciación de linfocitos induce la muerte celular por apoptosis.

Desactivación génica (*knockout*): uso de recombinación genética homóloga en células madre embrionarias para sustituir un gen funcional por una copia defectuosa del gen. Los animales obtenidos mediante esta técnica pueden cruzarse hasta lograr la homocigosis, lo que permite generar un fenotipo nulo para ese producto génico.

Desequilibrio de enlace: aparición de dos alelos heredados juntos con mayor frecuencia de la esperada, de acuerdo con el producto de sus frecuencias individuales.

Determinante antigénico: conjunto de epítopos (*véase* epítopo).

Diversidad combinatoria: diversidad de anticuerpos y receptores de la célula T (TCR) que se origina por la recombinación de los segmentos génicos variable (V), de diversidad (D, para las cadenas pesadas de la inmunoglobulina y para las cadenas β y α del TCR) y de unión (J).

Diversidad de unión: diversidad en el corte y el empalme de las uniones de los segmentos génicos recombinados variable (V), de diversidad (D, para las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas y para las cadenas β y δ del TCR) y el de unión (J) de los genes de anticuerpos y del receptor de célula T (TCR).

Dominio: elemento estructural de un polipéptido.

Edema: tumefacción causada por la acumulación de líquido en los tejidos.

ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzimas; *enzyme-linked immunosorbent assay*): prueba para la detección o la cuantificación de un anticuerpo o un antígeno mediante un ligando (p. ej., una antiinmunoglobulina) conjugado con una enzima que cambia el color de un sustrato.

Endocitosis: ingestión celular de macromoléculas por invaginación de la membrana plasmática y formación de una vesícula intracelular que encierra el material ingerido.

Endógeno: que se origina desde el interior.

Endosomas: vesículas intracelulares de superficie lisa, en las que el material incorporado por endocitosis sigue su camino hacia los lisosomas.

Endotoxina: lipopolisacáridos tóxicos asociados con la pared celular de bacterias gramnegativas.

Eosinófilo: clase de granulocito cuyos gránulos contienen proteínas catiónicas tóxicas.

Epítopo: parte de un antígeno reconocida por un receptor para el antígeno (*véase* determinante antigénico).

Equivalencia: proporción entre anticuerpo y antígeno en la que la inmunoprecipitación de los reactantes es casi completa.

Eritema: enrojecimiento que se produce durante la inflamación y es causado por el ingreso de eritrocitos en los espacios tisulares.

Eritropoyesis: producción de eritrocitos.

Estallido respiratorio: aumento del metabolismo oxidativo que tiene lugar en las células fagocíticas tras la activación.

Estocástico: proceso que implica al menos algún elemento al azar.

Evolución convergente: evolución independiente de similitudes entre moléculas o entre especies.

Exclusión alélica: fenómeno por el cual, después del reordenamiento adecuado de un alelo en un gen receptor de antígeno, se suprime el reordenamiento del otro alelo progenitor.

Exotoxina: proteína tóxica secretada por bacterias.

Exudado: líquido extravascular (que contiene proteínas y detritos celulares) que se acumula durante la inflamación.

Fab: fragmento monovalente de unión al antígeno que se obtiene tras la digestión con papaína de las inmunoglobulinas. Consta de una cadena ligera intacta y los dominios V_H y C_H1 N-terminales de la cadena pesada.

F(ab')$_2$: fragmento bivalente de unión al antígeno que se obtiene tras la digestión con pepsina de las inmunoglobulinas. Consta de dos cadenas ligeras y la porción N-terminal de ambas cadenas pesadas unidas por enlaces disulfuro.

Factor de necrosis tumoral (TNF, también denominado TNFα): junto con la citocina relacionada linfotoxina (TNFβ), en principio se denominó así por su efecto citotóxico sobre ciertas células tumorales, pero también tiene funciones inflamatorias e inmunorreguladoras importantes.

Factor reumatoideo: autoanticuerpos de IgM, IgG e IgA contra la región Fc de la IgG.

Factores estimulantes de colonias (*colony stimulating factors*; CSF): factores que permiten la proliferación y la diferenciación de células hematopoyéticas.

Fagocito: células, como monocitos o macrófagos y neutrófilos, especializados en la endocitosis de sustancia celular y particulada.

Fagolisosoma: vacuola intracelular en la que tiene lugar la destrucción y la digestión del material fagocitado después de la fusión del fagosoma con el lisosoma.

Fagosoma: vacuola intracelular producida después de la invaginación de la membrana celular en torno del material fagocitado.

Fas: miembro de la familia génica de receptores TNF. La ocupación de Fas (CD95) sobre la superficie de la célula por el ligando Fas (CD178) presente sobre las células citotóxicas puede inducir la apoptosis en la célula diana portadora de Fas.

Fc: fragmento cristalizable y no fijador de antígeno de una molécula de inmunoglobulina que se obtiene después de la digestión con papaína. Está formado por la porción C-terminal de ambas cadenas pesadas y determina la fijación a los receptores Fc y C1q.

Fibroblasto: célula del tejido conectivo que produce colágeno y desempeña una función importante en la curación de las heridas.

Formación de casquete: proceso activo por el cual los entrecruzamientos de las moléculas de la superficie celular (p. ej., por un anticuerpo) causan su agregación y la migración posterior de las moléculas hacia un polo de la célula.

Foxp3: factor de transcripción presente en el núcleo de la mayoría de las células T reguladoras.

Fv: fragmento de la región variable de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo.

scFv: molécula monocatenaria compuesta por las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo unidas mediante un conector flexible.

Gammaglobulinas: proteínas séricas, en su mayor parte inmunoglobulinas, que presentan la mayor movilidad hacia el cátodo en la electroforesis.

Genes *Ir* (de respuesta inmunitaria): genes, incluso los que pertenecen al CMH, que en conjunto determinan el nivel global de respuesta inmunitaria contra un antígeno dado.

Genoteca de anticuerpos fágicos: conjunto de secuencias génicas de región variable de anticuerpos clonados que pueden expresarse como proteínas de fusión Fab o scFv con proteínas de la cubierta del bacteriófago. Éstas pueden disponerse sobre la superficie de los fagos. El gen que codifica un anticuerpo monoclonal recombinante queda incluido en la partícula fágica y puede seleccionarse de la genoteca por la unión del bacteriófago al antígeno específico.

Glomerulonefritis: inflamación de las asas capilares del glomérulo renal, a menudo como consecuencia del depósito de inmunocomplejos.

Granulocito: células mieloides que contienen gránulos citoplasmáticos (es decir, neutrófilos, eosinófilos y basófilos).

Granuloma: nódulo tisular que contiene linfocitos en proceso de proliferación, fibroblastos y células gigantes y epitelioides (ambas derivadas de macrófagos activados), que se forma debido a la inflamación producida en respuesta a una infección crónica o a la persistencia del antígeno en los tejidos.

Granzimas: serinesterasas presentes en los gránulos de linfocitos T citotóxicos y células NK. Inducen apoptosis en la célula diana, en la que penetran a través de canales de perforina insertados en la membrana de la célula diana por la célula citotóxica.

H-2: complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) murino.

Haplotipo: conjunto de variantes alélicas presentes en determinada región genética.

Hapteno: molécula de bajo peso molecular reconocida por anticuerpos preformados, no inmunógena por sí misma, a menos que esté conjugada con una molécula "transportadora" que provea los epítopos reconocidos por las células T *helper*.

Hemaglutinina: cualquier molécula que aglutina eritrocitos.

Hematopoyesis: producción de eritrocitos, leucocitos y plaquetas.

Heterocigoto: que posee alelos diferentes en un locus dado de los dos cromosomas homólogos.

Hibridoma: línea celular híbrida obtenida por la fusión de una célula tumoral linfoide con un linfocito, que

así posee la inmortalidad de la célula tumoral y la función efectora del linfocito (p. ej., la secreción de anticuerpos monoclonales).

Hipermutación somática: mayor tasa de mutaciones puntuales en los genes V(D)J de la región variable de las inmunoglobulinas que se produce tras la estimulación antigénica y actúa como mecanismo para incrementar la diversidad y la afinidad del anticuerpo.

Hipersensibilidad: respuesta inmunitaria excesiva que genera consecuencias no deseadas, por ejemplo, daño tisular u orgánico.

Hipersensibilidad retardada: reacción de hipersensibilidad que tiene lugar en el transcurso de 48 a 72 horas y está mediada por la liberación de citocinas provenientes de células T sensibilizadas.

Histamina: amina vasoactiva presente en los gránulos de los basófilos y los mastocitos que, después de la desgranulación, causa el aumento de la permeabilidad vascular y la contracción del músculo liso.

HLA (antígeno leucocitario humano, *human leukocyte antigen*): complejo mayor de histocompatibilidad humano (CMH).

Homocigoto: que tiene el mismo alelo en un locus determinado en los dos cromosomas homólogos.

Humoral: perteneciente al líquido extracelular, como el plasma y la linfa. El término inmunidad humoral se utiliza para expresar respuestas inmunitarias mediadas por anticuerpos.

IDCG (*severe combined immunodeficiency*; inmunodeficiencia combinada grave): inmunodeficiencia que afecta tanto a los linfocitos T como a los B.

Idiotipo: conjunto completo de idiótopos de la región variable de un anticuerpo o un receptor de célula T que reacciona con un suero antiidiotipo.

Idiótopo: epítopo formado por aminoácidos dentro de la región variable de un anticuerpo o un receptor de célula T que reacciona con un antiidiótopo.

Idiótopo regulador: idiótopo del receptor de anticuerpo o de célula T capaz de regular las respuestas inmunitarias por medio de la interacción con linfocitos que poseen idiótopos complementarios (antiidiótopos).

IgA secretora: IgA dimérica que se encuentra en las secreciones seromucosas.

Imagen interna: epítopo sobre un antiidiotipo que se fija de modo tal que simula ser el antígeno tanto en lo referido a la estructura como a la función.

Inflamación: respuesta tisular al traumatismo caracterizada por aumento del flujo sanguíneo e ingreso de leucocitos en los tejidos, lo que produce tumefacción, enrojecimiento, aumento de la temperatura y dolor.

Inflamasoma: Complejo citoplasmático multiproteico que estimula la inflamación al convertir el precursor de la IL-1β en la IL-1β activa y, además, al estimular la formación de IL-18.

Inmunidad innata: inmunidad no afectada en forma intrínseca por el contacto previo con el antígeno, es decir, todos los aspectos de la inmunidad no mediados directamente por los linfocitos.

Inmunidad mediada por células (IMC): se refiere a las respuestas inmunitarias mediadas por células T.

Inmunoadsorción: método para la extracción de un anticuerpo o un antígeno después de su fijación a antígenos o anticuerpos en fase sólida.

Inmunocomplejo: complejo de anticuerpos unidos al antígeno que también puede contener componentes del complemento.

Inmunofluorescencia: técnica para la detección de antígenos asociados a células o tejidos mediante el uso de un ligando marcado con sustancias fluorescentes (p. ej., una antiinmunoglobulina conjugada con isotiocianato de fluoresceína).

Inmunógeno: cualquier sustancia que induce una respuesta inmunitaria. Mientras que todos los inmunógenos son antígenos, no todos los antígenos son inmunógenos (*véase* hapteno).

Inmunotoxina: conjugado bioquímico, o proteína de fusión recombinante, formada por una molécula inmunitaria selectiva, como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, junto con una molécula citotóxica.

Integrinas: familia de moléculas de adhesión celular que forman heterodímeros.

Interferones (IFN): el IFNα y el IFNβ pueden ser inducidos en la mayoría de los tipos celulares, mientras que el IFNγ lo producen los linfocitos T. Los tres tipos inducen un estado antiviral en las células, y el IFNγ actúa además como citocina en la regulación de las respuestas inmunitarias.

Interleucinas (IL): designación para algunas citocinas secretadas por los leucocitos.

Isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*; FITC): colorante fluorescente verde utilizado para "marcar" anticuerpos empleados en inmunofluorescencia.

Isotipo: estructura de la región constante de un anticuerpo presente en todos los individuos normales, es decir, clase o subclase de anticuerpo.

ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*, motivos de activación de inmunorreceptor basados en tirosina): secuencias aminoacídicas de consenso para tirosincinasas de la familia src. Estos motivos se encuentran en los dominios citoplasmáticos de varias moléculas de señalización, por ejemplo, las unidades de transducción de señal de los receptores de antígeno de los linfocitos y de los receptores Fc.

ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs*, motivos de inhibición de inmunorreceptor basados en tirosina): se encuentran en los dominios citoplasmáticos de ciertas moléculas de superficie celular, por ejemplo, FcγRIIB, receptores inhibitorios de células NK, que median señales inhibitorias.

KIR (*Killer cell Immunoglobulin-like Receptors*, receptores similares a inmunoglobulinas en las células *killer*): se encuentran en las células NK, algunas células T γδ y algunas αβ. Los KIR reconocen moléculas de clase I del CMH y, al igual que los receptores de lectina de tipo C que también se encuentran en estas células, pueden inhibir o activar las células *killer*. Si en sus dominios citoplasmáticos se encuentran secuencias ITIM, son inhibidores. Los KIR que carecen de ITIM se pueden asociar con moléculas adaptadoras que contienen ITAM, en cuyo caso pueden activar la célula NK o la célula T.

Lámina propia: tejido conectivo que se encuentra por debajo del epitelio en los sitios de la mucosa.

Lectinas: familia de proteínas que se unen a azúcares específicos de las glucoproteínas y los glucolípidos. Algunas lectinas son mitógenas (p. ej., PHA, ConA).

Lectina de unión a la manosa (proteína de unión a manosa): miembro de la familia de las colectinas, las lectinas dependientes de calcio y una proteína de fase aguda. Actúa como estimuladora de la lectina en la vía clásica de activación del complemento y como opsonina para la fagocitosis al unirse a la manosa, un residuo de azúcar que sólo suele hallarse en forma expuesta en la superficie de los microorganismos.

Leucocitos: glóbulos blancos que comprenden a los neutrófilos, los basófilos, los eosinófilos, los linfocitos, las células NK y los monocitos.

Leucotrienos: productos metabólicos del ácido araquidónico que favorecen los procesos inflamatorios (p. ej., quimiotaxis, aumento de la permeabilidad vascular) y son producidos por diversos tipos celulares, como mastocitos, basófilos y macrófagos.

Ligando: término general para una molécula reconocida por una estructura de unión, por ejemplo, un receptor.

Línea germinal: ordenamiento del material genético como es transmitido por los gametos.

Linfa: líquido tisular que drena hacia el sistema linfático y circula en su interior.

Linfadenopatía: agrandamiento de los ganglios linfáticos.

Linfocito granular grande: leucocitos (en su mayoría, no son realmente linfocitos verdaderos) que contienen gránulos citoplasmáticos y actúan como células *natural killer* (NK) y *killer* (K). Los linfocitos T citotóxicos CD8+ activados (Tc) también adoptan una morfología de LGG.

Linfocito T citotóxico (LTC, Tc): células T (por lo general CD8+) que destruyen células diana tras el reconocimiento del complejo péptido extraño-moléculas del CMH sobre la membrana de la célula diana.

Linfocito T *helper* (Th): subclase de células T que proporcionan la ayuda (bajo la forma de citocinas, interacciones relacionadas o ambas) necesaria para la expresión de la función efectora por otras células del sistema inmunitario.

Linfocito virgen: célula T o B madura que aún no ha sido activada por un encuentro inicial con el antígeno.

Linfotoxina (también denominada TNFβ): citocina proveniente de células T que es citotóxica para ciertas células tumorales y, asimismo, tiene funciones inmunorreguladoras.

Lipopolisacárido: endotoxina proveniente de las paredes celulares de bacterias gramnegativas con actividades inflamatoria y mitógena.

Lisosomas: orgánulos citoplasmáticos unidos a la membrana que contienen enzimas hidrolíticas e intervienen en la digestión del material fagocitado.

Lisozima: enzima antibacteriana que se encuentra en los gránulos de células fagocíticas, las lágrimas y la saliva, y digiere los peptidoglucanos de las paredes celulares de las bacterias.

Macrófago: célula fagocítica de gran tamaño que deriva del monocito sanguíneo y que también actúa como célula presentadora de antígeno y puede participar en la CCDA.

Marginación: adhesión de leucocitos al endotelio de los vasos sanguíneos durante la fase temprana de la reacción inflamatoria aguda.

Mastocito: célula tisular con abundantes gránulos, similar al basófilo sanguíneo. Ambos tipos celulares portan receptores Fc para IgE, en los que cuando se forman entrecruzamientos con IgE y antígeno producen la desgranulación y la liberación de varios mediadores, entre ellos, histamina y leucotrienos.

Médula: región interna (central) de un órgano.

Megacariocito: precursor de plaquetas en la médula ósea.

Memoria (inmunitaria): característica de la respuesta inmunitaria adquirida de los linfocitos por la cual un segundo encuentro con un antígeno dado produce una respuesta inmunitaria secundaria más rápida, intensa y prolongada que la respuesta inmunitaria primaria.

Memoria central: memoria inmunitaria que depende de las células T CCR7+ que, bajo la influencia de quimiocinas, se dirigen a los órganos linfoides secundarios en los que dan origen a las células T de memoria efectoras CCR7-.

β_2-microglobulina: proteína de 12 kDa no codificada dentro del CMH, pero que forma parte de la estructura de las moléculas de clase I codificadas en el CMH.

Mieloma múltiple: enfermedad maligna de los plasmocitos (células plasmáticas) que produce concentraciones elevadas de inmunoglobulina monoclonal en suero y de cadenas ligeras libres (proteína de Bence-Jones) en orina.

Mitógeno: sustancia que induce de manera inespecífica la proliferación de linfocitos.

Mitógeno de fitolaca (*pokeweed mitogen*; PWM): lectina vegetal que es un mitógeno de células B dependientes de células T.

Monocito: fagocito mononuclear de la sangre que es precursor del macrófago tisular.

Murino: relativo a ratones.

Neutrófilo: principal granulocito polimorfonuclear fagocítico circulante. Ingresa en los tejidos al comienzo de la respuesta inflamatoria y también puede mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA).

Nucleótidos N: Nucleótidos codificantes agregados a las uniones entre los segmentos génicos variable (V), de diversidad (D) y de unión (J) del anticuerpo (y el receptor de célula T) durante el reordenamiento génico.

Nucleótidos P: secuencias nucleotídicas palindrómicas generadas en las uniones entre los segmentos génicos variable (V), diversidad (D) y de unión (J) del anticuerpo y el receptor de célula T durante el reordenamiento génico.

Oligoclonal: designa algunos clones diferentes o el producto de éstos.

Opsonina: sustancia, por ejemplo un anticuerpo o un C3b, que aumenta la fagocitosis al facilitar la adhesión del antígeno al fagocito.

Opsonización: recubrimiento del antígeno con opsoninas para facilitar la fagocitosis.

Órganos linfoides primarios: sitios en los que se desarrollan los linfocitos inmunocompetentes, es decir, la médula ósea y el timo en los mamíferos.

PAF (*platelet activating factor*; factor activador de plaquetas): fosfolípido alquilado liberado por diversos tipos celulares, por ejemplo, mastocitos y basófilos, que tiene efectos inmunorreguladores sobre linfocitos y monocitos o macrófagos, además de causar agregación y desgranulación plaquetaria.

Patrón molecular asociado al riesgo (DAMP): estructura o molécula producida por las células necróticas y que provee señales de peligro para activar la respuesta inmunitaria tras el daño tisular.

Patrón molecular asociado con patógenos (PAMP): moléculas, como lipopolisacáridos, peptidoglucanos, ácidos lipoteicoicos y mananos, que se expresan ampliamente en patógenos microbianos como motivos repetidos, pero no se encuentran en tejidos del huésped. En consecuencia, son utilizadas por los receptores de reconocimiento de patrón (PRR) del sistema inmunitario para distinguir los patógenos de los antígenos propios.

Perforina: molécula producida por células T citotóxicas y células NK que, como el componente C9 del complemento, se polimeriza para formar un poro en la membrana de la célula diana que conduce a la muerte celular.

PHA (fitohemaglutinina): lectina vegetal que actúa como mitógeno de células T.

Placas de Peyer: parte del tejido linfoide asociado con el intestino (GALT), que se encuentra como nódulos linfáticos diferenciados, sobre todo en el intestino delgado.

Plasmocito (célula plasmática): linfocito B con diferenciación terminal que secreta activamente grandes cantidades de anticuerpos.

Policlonal: muchos clones diferentes, o el producto de muchos clones diferentes, por ejemplo, un antisuero policlonal.

Polimorfo: indica que es sumamente variable en estructura o secuencia.

Precipitina: precipitado de anticuerpo y antígeno multivalente, debido a la formación de complejos de elevado peso molecular.

Prostaglandinas: lípidos ácidos derivados del ácido araquidónico capaces de incrementar la permeabilidad vascular, mediar la fiebre y estimular o inhibir las respuestas inmunitarias.

Proteasoma: complejo de enzimas proteolíticas citoplasmáticas que intervienen en el procesamiento del antígeno para la formación de péptidos que se asocian con el CMH.

Proteína A: proteína de la pared celular de *Staphylococcus aureus* que se une a la región Fc de la IgG.

Proteína C reactiva: proteína de fase aguda capaz de fijarse a la superficie de los microorganismos, donde actúa como estimulador de la vía clásica de activación del complemento y como opsonina en la fagocitosis.

Prueba de Coombs: prueba diagnóstica en la que se utiliza antiinmunoglobulina para aglutinar eritrocitos recubiertos por anticuerpos.

Proteínas de fase aguda: proteínas séricas, en su mayoría producidas por el hígado, cuyas concentraciones cambian rápidamente (algunas aumentan, otras disminuyen) durante la iniciación de una respuesta inflamatoria.

Proteína del mieloma: anticuerpo monoclonal secretado por células del mieloma.

Quimera: combinación de células de individuos genéticamente diferentes, por ejemplo, después de un injerto alogénico de médula ósea.

Quimiocinas: familia de citocinas relacionadas desde el punto de vista estructural que inducen en forma selectiva la quimiotaxis y la activación de leucocitos. También desempeñan funciones importantes en el desarrollo de órganos linfoides, la compartimentalización celular dentro de los tejidos linfoides, el desarrollo de Th1/Th2, la angiogénesis y la curación de las heridas.

Quimiotaxis: desplazamiento de células a favor del gradiente de concentración de factores quimiotácticos.

Radioinmunoconjugado: conjugado bioquímico compuesto por una molécula diana del sistema inmunitario, como un anticuerpo o un fragmento de éste, junto con un radionúclido citotóxico.

Ratón atímico (desnudo): ratón deficiente en células T como resultado de un defecto génico homocigótico (*nu/nu*) que causa la ausencia de timo (y también de pelo corporal).

Reacción injerto contra huésped (ICH): reacción que tiene lugar cuando los linfocitos T presentes en un injerto reconocen y atacan las células del huésped.

Reacción linfocítica mixta (*mixed lymphocyte reaction*; MLR): respuesta proliferativa de células T inducida por células que expresan CMH alogénico.

Receptor de célula T (TCR): el receptor de antígeno heterodimérico de los linfocitos T se encuentra en dos formas alternativas, compuesto por cadenas α y β, o γ y δ. El TCR $\alpha\beta$ reconoce fragmentos peptídicos de antígenos proteicos presentados por moléculas del CMH sobre las superficies celulares. La función de TCR $\gamma\delta$ está menos definida, pero con frecuencia puede reconocer proteínas nativas sobre la superficie celular.

Receptor de reconocimiento de patrón (*pattern recognition receptor*; PRR): receptores asociados con células o solubles que le permiten al sistema inmunitario reconocer patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP) y patrones moleculares asociados al peligro (DAMP). Entre la gran cantidad de PRR distintos, se hallan los receptores para manosa (CD206), los receptores depuradores de los macrófagos (CD204) y los receptores de tipo Toll.

Receptor poli-Ig: molécula receptora que se une específicamente a la cadena J que contiene Ig polimérica, es decir, la IgA secretora dimérica y la IgM pentamérica, y la transporta a través del epitelio de la mucosa.

Receptores de asentamiento (*homing*): moléculas de superficie de la célula que dirigen a los leucocitos a localizaciones específicas en el organismo.

Receptores depuradores (*scavenger*): receptores de la superficie celular, por ejemplo sobre las células fagocíticas, que reconocen células o moléculas que requieren la eliminación del cuerpo.

Receptores Fc: receptores de la superficie celular que se unen a la porción Fc de clases particulares de inmunoglobulinas.

Receptores de tipo Toll (TLR): familia de receptores de reconocimiento de patrón que participan en la detección de estructuras asociadas con patógenos o tejidos dañados del huésped.

Recombinación de cambio de clase: recombinación de los segmentos génicos de la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina; por ejemplo, el cambio de Cμ y Cδ a Cγ1 para convertir un anticuerpo IgM (e IgD) en un anticuerpo IgG1.

Red idiotípica: red reguladora basada en las interacciones entre idiotipos y antiidiotipos presentes sobre los anticuerpos y los receptores de célula T.

Región bisagra: aminoácidos situados entre las regiones Fab y Fc de las inmunoglobulinas que permiten la flexibilidad de la molécula.

Región paracortical: parte de un órgano (p. ej., ganglio linfático) ubicada entre la corteza y la médula.

Regiones determinantes de complementariedad (*complementarity determining regions*; CDR): secuencias hipervariables de aminoácidos dentro de las regiones variables del anticuerpo y del receptor de células T, que interactúan con aminoácidos complementarios sobre el antígeno o el complejo péptido-CMH.

Regiones hipervariables: secuencias de aminoácidos dentro de las regiones variables de las inmunoglobulinas y el receptor de célula T que muestran la máxima variabilidad y contribuyen en mayor medida con el sitio de unión con el antígeno o el péptido-CMH.

Regiones marco (*framework*): secuencias de aminoácidos relativamente conservadas que flanquean las regiones hipervariables en las inmunoglobulinas y las regiones variables del receptor de células T, y mantienen una estructura global común para todos los dominios de la región V.

Resonancia plasmón de superficie: técnica basada sobre cambios en el ángulo de luz reflejada que tiene lugar ante la unión del ligando a una molécula diana inmovilizada sobre un dispositivo (chip) biosensor. Esto permite observar las interacciones entre proteínas (p. ej., la unión de un anticuerpo con un antígeno) en "tiempo real", es decir, a través de la monitorización continua de la asociación y la disociación de la reacción reversible.

Respuesta inmunitaria adquirida: inmunidad mediada por linfocitos y caracterizada por la especificidad de antígeno y la memoria.

Respuesta inmunitaria primaria: respuesta inmunitaria relativamente débil que tiene lugar después del primer encuentro de linfocitos vírgenes con un antígeno determinado.

Respuesta inmunitaria secundaria: respuesta inmunitaria mejorada en sentido cuantitativo y cualitativo que tiene lugar ante el segundo encuentro de los linfocitos sensibilizados (cebados) con un antígeno dado.

Restricción del CMH: necesidad de que las células T sólo reconozcan el antígeno procesado cuando es presentado por las moléculas del CMH del haplotipo original asociado con el cebado de las células T.

Roseta: partículas o células unidas a la superficie de un linfocito (p. ej., eritrocitos de carnero alrededor de una célula T humana).

Secuencia señal de recombinación (*recombination signal sequence*; RSS): secuencias conservadas heptaméricas (de 7 nucleótidos)-nonaméricas (de 9 nucleótidos), separadas por un espaciador de 12 o 23 bases que aparece en posición 3' de los segmentos génicos variables, 5' y 3' de los segmentos génicos de diversidad y 5' de los segmentos génicos de unión, tanto en los genes de receptores de inmunoglobulinas como en los de células T. Actúan como secuencias de reconocimiento para las enzimas recombinasas que median el proceso de reordenamiento génico relacionado con la generación de diversidad de receptor de antígeno linfocítico.

Secuencias de cambio: secuencias repetidas altamente conservadas que median el cambio de clase en el locus génico de la cadena pesada de la inmunoglobulina.

Segmentos génicos de diversidad (D): se encuentran en el gen de la cadena pesada de una inmunoglobulina y en los locus génicos α y δ del receptor de células T, entre los segmentos génicos V y J. Codifican parte de la tercera región hipervariable (CDR3) de estas cadenas del receptor para el antígeno.

Segmentos génicos de unión (J): se encuentran en los locus génicos de las inmunoglobulinas y del receptor de células T y, cuando tiene lugar el reordenamiento génico, codifican parte de la tercera región hipervariable (CDR3) de los receptores para el antígeno.

Segmentos génicos variables (V): genes que en conjunto se reordenan con los segmentos génicos D (de diversidad) y J (de unión) con el fin de codificar las secuencias de aminoácidos de la región variable de los receptores de inmunoglobulinas y de células T.

Selección clonal: selección y activación por el antígeno de un linfocito que posee un receptor complementario, que después prolifera hasta formar un clon expandido.

Selección negativa: eliminación por apoptosis de las células T del timo que reconocen los péptidos propios presentados por moléculas propias del CMH, por lo que evitan el desarrollo de células T autoinmunitarias. Se considera que la selección negativa de las células B en desarrollo también tiene lugar si encuentran niveles elevados de autoantígenos en la médula ósea.

Selección positiva: selección de aquellas células T que se desarrollan en el timo y son capaces de reconocer las moléculas propias del CMH. Esto sucede cuando es impedida la apoptosis de estas células.

Sinapsis inmunitaria: punto de contacto entre la célula T y la célula presentadora de antígeno generado por el reordenamiento y la agrupación de moléculas de superficie celular en balsas (*rafts*) de lípidos. La sinapsis facilita las interacciones entre TCR y CMH, moléculas coestimuladoras y de adhesión, por lo que potencia la señal de activación mediada por TCR.

Síndrome de DiGeorge: inmunodeficiencia causada por la insuficiencia congénita en el desarrollo del timo que da como resultado la falta de células T maduras funcionales.

Singénico: genéticamente idéntico, por ejemplo, una cepa de ratones obtenida por cruzamiento endogámico.

Sistema de fagocitos mononucleares: sistema que comprende los monocitos sanguíneos y los macrófagos tisulares.

Sistema reticuloendotelial: término bastante antiguo para indicar la red de fagocitos y las células endoteliales en todo el organismo.

Sistémico: que se da en todo el cuerpo.

Superantígeno: antígeno que reacciona con todos los linfocitos pertenecientes a una familia particular de receptores de células T o de la región V de inmunoglobulina y que, por consiguiente, estimula (o suprime) una cantidad mucho mayor de células que un antígeno convencional.

Superfamilia de inmunoglobulinas: gran familia de proteínas que se caracterizan por contener dominios del "tipo de inmunoglobulinas", de unos 110 aminoácidos, plegados en dos láminas plegadas β. Comprende inmunoglobulinas, receptores de células T y moléculas del CMH.

TAP: los transportadores asociados con el procesamiento del antígeno (TAP-1 y TAP-2) son moléculas que transportan péptidos antigénicos desde el citoplasma hacia el interior de la luz del retículo endoplasmático, para la incorporación en moléculas de clase I del CMH.

Tejido linfoide asociado a mucosas (*mucosa-associated lymphoid tissue*; MALT): tejido linfoide presente en la superficie mucosa de las vías respiratorias y genitourinarias y del tracto gastrointestinal.

Tejido linfoide asociado al intestino (*gut-associated lymphoid tissue*; GALT): incluye las placas de Peyer, el apéndice y los ganglios linfáticos solitarios de la submucosa.

Timocito: célula T que se desarrolla en el timo.

Tirosincinasas: enzimas capaces de fosforilar las proteínas de las tirosinas; a menudo actúan como una cascada en el sistema de transducción de señales de las células.

Título: medida de la "fuerza" relativa (combinación de cantidad y avidez) de un anticuerpo o un antisuero, por lo general determinado como la máxima dilución que aún se pueda detectar en los métodos de determinación, por ejemplo, en ELISA.

Tolerancia: falta de respuesta inmunitaria específica.

Tolerancia central: tolerancia inmunitaria específica debida a la inducción de apoptosis linfocítica o anergia dentro de los órganos linfoides primarios (la médula ósea en el caso de tolerancia de células B y el timo en el de células T).

Tolerancia periférica: tolerancia inmunitaria específica que sucede fuera de los órganos linfoides primarios.

Tolerógeno: antígeno utilizado para inducir tolerancia. A menudo depende más de las circunstancias de administración (p. ej., vía y concentración) que de cualquier propiedad inherente a la molécula.

Toxoide: toxina modificada por medios químicos o físicos que ya no es perjudicial, pero mantiene la inmunogenicidad.

Transportador: cualquier molécula que cuando se conjuga con una molécula no inmunógena (p. ej., un hapteno) la transforma en inmunógena al proporcionarle epítopos para las células T *helper*, de los cuales carece el hapteno.

Vaina linfoide periarteriolar (*periarteriolar lymphoid sheath*; PALS): tejido linfático que forma la pulpa blanca del bazo.

Vénula de endotelio alto: vénula capilar compuesta por células endoteliales especializadas que permiten la migración de linfocitos hacia el interior de los órganos linfoides.

Vía alternativa (de activación del complemento): vía de activación en la que intervienen componentes del complemento C3, factor B, factor D y properdina que, en presencia de una superficie activadora estabilizante, como un polisacárido microbiano, genera la C3 convertasa de la vía alternativa, $\overline{\text{C3bBb}}$.

Vía clásica (de activación de complemento): vía de activación que comprende los componentes C1, C2 y C4 del complemento que, tras la fijación de C1q, por ejemplo mediante complejos antígeno-anticuerpo, produce la C3 convertasa de la vía clásica, $\overline{\text{C4b2a}}$.

Virus de Epstein-Barr (EBV): virus que causa la mononucleosis infecciosa y el linfoma de Burkitt. Se usa para inmortalizar células B humanas *in vitro*.

Xenogénico: diferencias genéticas entre especies.

Xenoinjerto: injerto de tejido u órgano entre individuos de especies diferentes.

Zona marginal: zona externa de la vaina linfática periarteriolar del bazo (PALS), con alto contenido de células B, sobre todo las que responden a los antígenos timoindependientes.

Índice analítico

A

B

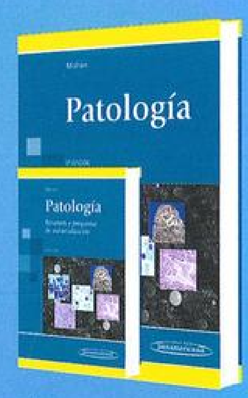
C

F

M

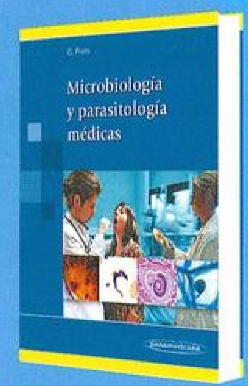
N

Q



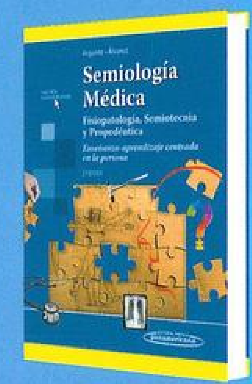


Mohan
Patología, 6.ª edición + Resumen y preguntas de autoevaluación, 3.ª edición
952 páginas / rústica / 21 x 27 / 2012





G. Prats
Microbiología y parasitología médicas
601 páginas / rústica / 21 x 28 / 2013





Argente • Álvarez
Semiología Médica
Fisiopatología, Semiotecnia y Propedéutica. Enseñanza – aprendizaje centrada en la persona, 2.ª edición
1632 páginas / tapa dura / 20 x 28 / 2013

Delves • Martin • Burton • Roitt

Roitt Inmunología Fundamentos

12.ª EDICIÓN

Inmunología, Fundamentos, de Roitt, con 40 años en el mercado, es el libro más leído sobre la especialidad y se ha consagrado como el preferido por los estudiantes de inmunología de todo el mundo. La decimosegunda edición sigue a la vanguardia de este fascinante campo de la ciencia y brinda una actualización completa de los conocimientos y conceptos más modernos acerca de cómo actúa el sistema inmunitario en la salud y en la enfermedad. Su característica distintiva es la claridad con la que introduce al lector en esta disciplina compleja, su énfasis tanto en las bases del conocimiento como en las aplicaciones clínicas, y sus excelentes fotografías e ilustraciones a todo color. Sus aspectos sobresalientes son:

- Incluye magníficas ilustraciones y herramientas didácticas, como *Conceptos clave* y *A modo de resumen…* al comienzo de cada capítulo, que destacan los hallazgos y principios fundamentales, recuadros sobre *Avances y descubrimientos*, iconos para los materiales complementarios en el sitio web y una síntesis final, ideales para el estudio y el repaso rápidos.
- Provee información novedosa sobre los defectos genéticos de las inmunodeficiencias, el origen del sida y el número creciente de fármacos contra esta enfermedad, y los resultados de los últimos ensayos clínicos de vacunas contra el HIV.
- Brinda una amplia descripción, entre otros temas, de los patrones moleculares asociados con los patógenos y con el daño, las células dendríticas y su función en el procesamiento del antígeno, los receptores de células B y de NK, la circulación de los linfocitos, las subpoblaciones de células T, sobre todo de las células Th17 y la diversidad de células T reguladoras, y los efectos del envejecimiento sobre las respuestas inmunitarias.
- Contiene un sitio web complementario, **www.roitt.com** (en inglés) que incluye preguntas de elección múltiple interactivas, con sus respuestas; animaciones y videos que explican los conceptos claves; figuras que pueden descargarse; lecturas adicionales de la *Encyclopaedia of Life Sciences*; enlaces de interés; y archivos de audio (*podcasts*) para reafirmar los principios claves explicados en el texto.

Su claridad y capacidad para transmitir una visión equilibrada y actualizada de la inmunología harán que los estudiantes de medicina o de otras ciencias de la salud, que se acercan por primera vez a sus misterios, pero también el inmunólogo avanzado, consideren la lectura de esta obra una aventura placentera.

ISBN: 978-607-7743-93-4



7743934 9 78607

EDITORIAL MEDICA panamericana